

Université de Sherbrooke

**La phosphatase Shp-2 inhibe les dommages à l'ADN et la prolifération cellulaire**

Par Vanessa Vaillancourt-Lavigueur

Programme de Biologie Cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et sciences de la santé en vue de l'obtention du  
grade maitre ès science (M. Sc.) en Biologie Cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada, 2018

Membres du jury d'évaluation

Pre Nathalie Rivard, programme de Biologie Cellulaire  
Pr François Boudreau, programme de Biologie Cellulaire  
Pr Benoit Chabot, programme de Microbiologie

© Vanessa Vaillancourt-Lavigueur, 2018

## RÉSUMÉ

### Rôle de Shp-2 dans le contrôle de la sénescence des cellules normales et cancéreuses intestinales humaines.

Par Vanessa Vaillancourt-Lavigueur, Programme de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en Biologie Cellulaire, Faculté de médecine et sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4.

La protéine tyrosine phosphatase SHP-2 est connue pour contrôler de nombreuses voies de signalisation intracellulaire importantes dans la cellule telles que les voies RAS/MAP Kinase, JAK/STAT et PI3K/AKT. Conséquemment, cette phosphatase régularise de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la survie, la migration et la différenciation. De manière intéressante, le gène encodant SHP-2, le gène *PTPN11*, est fréquemment muté dans les cancers, particulièrement les leucémies, mais également dans des cancers solides comme le cancer colorectal. Des travaux dans notre laboratoire ont récemment montré que l'expression dans les cellules de l'épithélium intestinal murin de la forme mutante active de SHP-2, celle retrouvée dans le cancer colorectal, induit une hyperprolifération cryptale mais n'est pas suffisante pour induire une tumorigénèse intestinale. Par contre, l'expression de cette forme mutante chez la souris *Apc<sup>Min/+</sup>* favorise grandement la polypose et ce, tant dans l'intestin grêle que dans le côlon. De plus, l'inhibition d'expression de SHP-2 dans des lignées cancéreuses colorectales humaines diminue significativement leur capacité à croître en indépendance d'ancrage. Pris ensemble, ces résultats suggèrent donc que SHP-2 n'est pas un oncogène en soi pour l'épithélium intestinal mais promeut néanmoins la tumorigénèse des cellules intestinales et leurs propriétés tumorales. Cependant, les mécanismes impliqués restaient à comprendre. Durant mes travaux de maîtrise, j'ai inhibé génétiquement l'expression de SHP-2 (lentivirus exprimant un shARN ciblant SHP-2 ou utilisation de la Cre recombinase) et ce, dans des cellules épithéliales intestinales normales (HIEC), dans des lignées cancéreuses colorectales humaines (Caco-2/15, HCT116) ainsi que dans des cultures d'organoides *ex vivo*. Des inhibiteurs pharmacologiques ont été aussi utilisés pour inactiver SHP-2. Mes résultats montrent que la baisse d'expression de SHP-2 dans les HIEC et les HCT116 entraîne un ralentissement du cycle cellulaire en G1 et des dommages à l'ADN. De la sénescence a été également observée dans les cellules normales, probablement induite via la voie de ARF et p53. Par contre dans les Caco-2/15, l'inhibition d'expression de SHP-2 ralentit la prolifération cellulaire mais n'induit pas de dommages à l'ADN. De manière remarquable, la délétion de SHP-2 dans des cultures d'entéroïdes et de colonoides *ex vivo* diminue grandement leur capacité proliférative et leur développement. Les entéroïdes finissent même par dégénérer suite à la délétion de SHP-2 et cette dégénérescence est corrélée avec l'induction de *Pml*, un gène cible de p53 associé à la sénescence et/ou à l'apoptose. En résumé, nos résultats suggèrent que SHP-2 protège les cellules épithéliales intestinales contre un stress oncogénique conduisant à des dommages à l'ADN et/ou à la sénescence.

Mots clés : SHP-2, sénescence, dommages à l'ADN, cellules épithéliales intestinales, organoïdes



## Table des matières

<b>RÉSUMÉ .....</b>	<b>i</b>
<b>Liste des schémas .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>vi</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>vii</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Le système digestif .....</b>	<b>1</b>
1.1 La digestion .....	1
1.2 L'intestin grêle.....	2
1.2.1 L'épithélium intestinal .....	3
1.3 Le côlon .....	5
<b>2. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal .....</b>	<b>6</b>
2.1 La voie Wnt/ $\beta$ -caténine.....	6
2.2 La voie de signalisation RAS/ERK (Extracellular signal-regulated kinase 1/2)/MAPK (Mitogen-activated protein kinases).....	9
2.3 La voie de signalisation Notch.....	11
<b>3. Cancer colorectal .....</b>	<b>12</b>
3.1 Cancer colorectal sporadique.....	13
<b>4. Le cycle cellulaire.....</b>	<b>15</b>
4.1 Les phases du cycle cellulaire .....	15
4.2 La progression du cycle cellulaire.....	15
4.3 La sénescence cellulaire .....	17
<b>5. La phosphatase SHP-2, un régulateur important de la cellule.....</b>	<b>22</b>
5.1 Généralités .....	22
5.2 Signalisation régulée par SHP-2 .....	23
5.2.1 Voie de RAS/ERK .....	23
5.2.2 Voie de JAK/STAT .....	24
5.3 Les pathologies associées à la tyrosine phosphatase SHP-2 .....	25
5.3.1 Syndrome de Noonan .....	25
5.3.2 Leucémie et autres cancers.....	25
5.3.3 SHP-2 et cancer colorectal .....	27
<b>6. Sénescence, cancers et SHP-2 .....</b>	<b>28</b>
6.1 Cancer du sein .....	28
6.2 Glioblastome .....	29
<b>7. Hypothèse de recherche .....</b>	<b>30</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>31</b>
<b>1. Matériel .....</b>	<b>31</b>
1.1 Anticorps et molécules .....	31

<b>2. Méthodes</b>	<b>31</b>
2.1 Souris	31
2.2 Mise en culture d'organoïdes	33
2.2.1 Mise en culture du jéjunum (Entéroïdes)	33
2.2.2 Mise en culture de côlon (Colonoïdes)	34
2.3 Culture d'organoïdes et passages	35
2.4 Incorporation de l'EdU	36
2.5 Induction de la délétion de Shp-2 à l'aide du tamoxifène	36
2.6 Culture cellulaire	37
2.6.1 Production des lentivirus	37
2.6.2 Infection des cellules	38
2.7 Lyse cellulaire	39
2.8 Immunobuvardage	39
2.9 Extraction d'ARN de cellules et d'organoïdes	40
2.10 Immunofluorescence	41
2.10.1 Immunofluorescence des cellules ensemencées sur lamelle	41
2.10.2 Immunofluorescence BrdU sur cellules	41
2.11 Inhibiteur pharmacologique	42
2.11.1 Inhibiteur pharmacologique de Shp-2 PTP IIB08	42
2.11.2 Inhibiteur pharmacologique de Shp-2 soit le SHP099	42
2.12 Essai de coloration pour la détection de l'activité $\beta$ -Galactosidase	42
2.13 Analyses statistiques	43
<b>Résultats</b>	<b>44</b>
1. L'inhibition d'expression de la phosphatase SHP-2 induit la sénescence dans les cellules épithéliales intestinales normales humaines	44
2. La délétion de SHP-2 inhibe le développement des organoïdes intestinaux.	49
2.1 Entéroïdes	49
2.2 Colonoïdes	54
3. L'inhibition pharmacologique de SHP-2 altère le développement des organoïdes intestinaux.	57
4. Impact de l'inhibition de SHP-2 dans les cellules cancéreuses colorectales	60
4.1 Cellules Caco-2/15	60
4.2 Cellules HCT116	62
<b>Discussion</b>	<b>67</b>
1. SHP-2 prévient la sénescence dans les cellules épithéliales intestinales humaines non-immortalisées.	67
2. L'inactivation génétique ou pharmacologique de SHP-2 inhibe le développement et la survie des entéroïdes <i>ex vivo</i> .	70
3. L'inactivation génétique ou pharmacologique de SHP-2 inhibe le développement des colonoïdes <i>ex vivo</i> .	74
4. L'inhibition de SHP-2 induit des dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses colorectales HCT116 mais pas dans les Caco-2/15	74

<b>Quelques perspectives importantes pour la suite du projet.....</b>	<b>77</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>79</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>80</b>
<b>Références .....</b>	<b>81</b>

## Liste des schémas

### Introduction:

<b>Schéma 1</b> : Structure de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle.....	<b>4</b>
<b>Schéma 2</b> : Structure de l'axe crypte colonique.....	<b>5</b>
<b>Schéma 3</b> : Voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine.....	<b>8</b>
<b>Schéma 4</b> : Activation et inactivation de la protéine RAS.....	<b>10</b>
<b>Schéma 5</b> : Voie de signalisation Notch.....	<b>12</b>
<b>Schéma 6</b> : Schéma de la cascade de carcinogénèse.....	<b>13</b>
<b>Schéma 7</b> : Les voies moléculaires de carcinogénèse colorectale.....	<b>14</b>
<b>Schéma 8</b> : Représentation du cycle cellulaire et de ses protéines régulatrices.....	<b>16</b>
<b>Schéma 9</b> : Inducteurs de la sénescence.....	<b>18</b>
<b>Schéma 10</b> : Voies classiques menant à la sénescence cellulaire.....	<b>19</b>
<b>Schéma 11</b> : Caractéristiques des cellules sénescents.....	<b>20</b>
<b>Schéma 12</b> : Détection de l'expression de la $\beta$ -Galactosidase associée à la sénescence cellulaire.....	<b>20</b>
<b>Schéma 13</b> : Conformations de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2.....	<b>23</b>
<b>Schéma 14</b> : Régulation de la voie de signalisation RAS/ERK et de la voie de signalisation JAK/STATS par SHP-2.....	<b>24</b>
<b>Schéma 15</b> : Mutations dans le gène PTPN11.....	<b>26</b>

### Matériels et Méthodes:

<b>Schéma 1</b> : Activation de la Cre recombinaise inductible par l'injection de tamoxifène chez la souris.....	<b>32</b>
--	-----------

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : La baisse d'expression de SHP-2 affecte la morphologie des HIEC.....	<b>44</b>
<b>Figure 2</b> : La baisse d'expression de SHP-2 diminue la prolifération des cellules HIEC.....	<b>45</b>
<b>Figure 3</b> : La baisse d'expression de SHP-2 induit la sénescence chez les cellules HIEC.....	<b>46</b>
<b>Figure 4</b> : Impact de la baisse d'expression de SHP-2 sur le niveau d'activation des voies ARF et p16-dépendantes.....	<b>47</b>
<b>Figure 5</b> : La baisse d'expression de SHP-2 induit des dommages à l'ADN dans les HIEC.....	<b>48</b>
<b>Figure 6</b> : Analyse de l'expression de Shp-2 dans les entéroïdes <i>Shp-2<sup>CEI-KOER</sup></i> traités au tamoxifène.....	<b>49</b>
<b>Figure 7</b> : La délétion de SHP-2 altère le développement des entéroïdes.....	<b>50</b>
<b>Figure 8</b> : La délétion de Shp-2 inhibe le développement des entéroïdes.....	<b>51</b>
<b>Figure 9</b> : La baisse d'expression de Shp-2 inhibe la prolifération des entéroïdes.....	<b>52</b>
<b>Figure 10</b> : La délétion de Shp-2 module l'expression de gènes-cibles de p53.....	<b>53</b>
<b>Figure 11</b> : Analyse de l'expression de Shp-2 dans les colonoïdes <i>Shp-2<sup>CEI-KOER</sup></i> traités au tamoxifène.....	<b>54</b>
<b>Figure 12</b> : La délétion de Shp-2 dans les colonoïdes ralentit leur croissance.....	<b>55</b>
<b>Figure 13</b> : La délétion de Shp-2 réduit la taille des colonoïdes en culture.....	<b>56</b>
<b>Figure 14</b> : La délétion de Shp-2 dans les colonoïdes diminue le nombre de cellules prolifératives.....	<b>56</b>
<b>Figure 15</b> : L'inhibition pharmacologique de Shp-2 avec le PTP IIB08 ou bien avec l'inhibiteur pharmacologique de Shp-2 le SHP099 altère la croissance des entéroïdes.....	<b>58</b>
<b>Figure 16</b> : L'inhibition pharmacologique de SHP-2 avec le PTP IIB08 altère la croissance des colonoïdes.....	<b>59</b>
<b>Figure 17</b> : L'inhibition d'expression de SHP-2 dans les cellules cancéreuses Caco-2/15 n'altère pas leur morphologie.....	<b>60</b>
<b>Figure 18</b> : L'inhibition d'expression de SHP-2 dans les Caco-2/15 ralentit leur prolifération mais n'induit pas de dommages à l'ADN.....	<b>61</b>
<b>Figure 19</b> : La baisse d'expression de SHP-2 dans les cellules cancéreuses HCT116 altère leur morphologie.....	<b>63</b>
<b>Figure 20</b> : La baisse d'expression de SHP-2 dans les cellules HCT116 ralentit leur prolifération.....	<b>64</b>
<b>Figure 21</b> : Impact de la baisse d'expression de SHP-2 sur les voies ARF/p53 et p16 dans les cellules HCT116.....	<b>65</b>
<b>Figure 22</b> : La baisse d'expression de SHP-2 induit des dommages à l'ADN dans les cellules HCT116.....	<b>66</b>

## Liste des abréviations

ADAM : *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*

AKT : protéine kinase B

APC : *adenomatous polyposis coli*

APL : Leucémie promyélocytaire aiguë

ATM : *ataxia telangiectasia mutated*

BrdU : Bromodéoxyuridine

CIN : Instabilité chromosomique

CIMP : Méthylation des îlots CpG

CK1 $\alpha/\delta$  : caséine kinase 1  $\alpha/\delta$

Co2 : Dioxyde de carbone

Dsh ou Dvl : *Dishevelled*

DMSO : Dimethyl sulfoxide

ECL : *Enhanced chemiluminescence*

EGFR : *Epidermal Growth Factor receptor*

ER : Récepteur de l'œstrogène

ERK1/2 : *Extracellular signal-regulated kinase 1/2*

FOS : FOS proto-oncogene, *AP\*1 transcription factor subunit*

Fz : *Frizzled*

GAP : *GTPase-Activating Protein*

GDP : Guanine Di-Phosphate

GEF : Guanine nucleotide exchange factor

GRB2 : *Growth Factor Receptor Bound protein 2*

GSK3 $\alpha/\beta$  : glycogen synthase kinase 3  $\alpha/\beta$

GTP : Guanosine Tri-Phosphate

H3K9me3 : histone 3 triméthylée sur la lysine 9

HEPES : *4-(2-hydroxyethyl) -1-piperazineethanesulfonic acid*

Hes : *Hairy enhancer of split*

HRP : *Horseradish peroxidase*

JAK : *Janus kinase*

JMML : leucémie myélomonocytaire juvénile

LRP5/LRP6 : *LDL receptor-related proteins 5 and 6*

MALT : *mucosa-associated lymphatic tissue*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MDM2 : *The mouse double minute 2*

MEK : *Mitogen activated protein kinase kinase*

MLH1 : *mutL homolog 1*

MSH2 : *mutS protein homolog 2*

MSH6 : *mutS homolog 6*

MSI : Instabilité des microsatellites

MMR : *MisMatch repair*

Myc : *MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor*

NICD : *Notch intracellular domain*

PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
PAI1 : Inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1  
PAF : Polypose adénomateuse familiale  
PBS : *Phosphate Buffered Saline*  
PCR : *Polymerase Chain Reaction*  
PCP : *Planar cell polarity*  
PFA : Paraformaldéhyde  
PKC : Protéine kinase C  
PMS2 : *Postmeiotic Segregation Increased 2*  
PML : Leucémie promyélocytaire  
PTPN11 : *Protein tyrosine phosphatase non receptor type 11*  
RAF : *Rapidly accelerated fibrosarcoma*  
RB : Rétinoblastome  
RBPJ : *Recombining binding protein suppressor of hairless*  
SASP : *Senescence associated secretory phenotype*  
SAFH : *Senescence-associated beta-heterochromatic foci*  
SDS-PAGE : *Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
SH-2 : *Src homology 2*  
SHP-2 : *Src Homology 2 domain-containing Phosphatase 2*  
SOS : *Son Of Seveless*  
Sox9 : *SRY (sex determining region Y)-box 9*  
STAT : *Signal Transducers and Activators*  
TCF/LEF : *T-cell factor/lymphoid enhancer factor*  
TFF : *Trefoil factors*  
TGF : *Transforming growth factor*  
Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside  
Wnt : *Wingless and int-1*  
WTX : *Wilms tumor gene on the X-chromosome*

## Introduction

### 1. Le système digestif

#### 1.1 La digestion

L'appareil digestif va comprendre l'ensemble des organes qui va assurer la transformation ainsi que la dégradation des aliments afin de permettre l'assimilation des nutriments dans le sang et leur redistribution dans les cellules. Il y a deux types d'organes soit les organes du tube digestif ainsi que les organes/glandes annexes qui remplissent deux types d'action : chimique ou mécanique. Les organes du tube digestif sont : la bouche, le pharynx, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le côlon et finalement l'anus. Les organes annexes eux sont : les dents, la langue, la vésicule biliaire, les glandes salivaires, le foie et le pancréas. Les glandes digestives annexes (glandes salivaires, foie et pancréas) ont notamment pour rôle la production d'hormones et de sécrétions servant à la digestion des aliments. Lors de la prise des aliments, le premier contact sera l'entrée dans la bouche qui est donc la zone d'ingestion des aliments. Par la suite, la nourriture fera son entrée dans l'œsophage via le pharynx à l'aide des processus de déglutition ainsi que du péristaltisme. Le péristaltisme permet aux aliments d'avancer à l'aide de la contraction des muscles lisses. Suite à cela, la nourriture va dans l'estomac. L'estomac effectue la première étape de digestion. Une fois la digestion terminée dans l'estomac, le bol alimentaire, ou le chyme, sera évacué par le pylore. La vidange du chyme entre par la suite dans la première partie de l'intestin, soit le duodénum, pour ensuite continuer vers le jéjunum et finalement l'iléon. Le bol alimentaire entrera dans le côlon passant par le caecum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde, pour terminer son cheminement au rectum et sera évacué via l'anus (Marieb et Hoehn, 2015).

Les parois du tube digestif sont composées de quatre couches principales soit : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse. La muqueuse est la partie la plus interne et se compose d'épithélium, d'une lamina propria et d'une muscularis mucosae. La muqueuse permet la sécrétion de mucus, la protection contre des maladies infectieuses via sa fonction barrière ainsi que l'absorption des produits de la digestion vers la circulation. L'épithélium qui compose la muqueuse est un épithélium simple prismatique qui est riche en cellules absorbantes ainsi qu'en cellules qui sécrètent du mucus. Ce mucus assure une certaine protection pour ne pas que les



enzymes digestives détruisent les tissus et il permet aussi le déplacement des aliments. Située sous l'épithélium, la lamina propria est composée de tissu conjonctif lâche aléatoire. Elle contient des MALT (mucosa-associated lymphatic tissue) qui permettent la défense contre des bactéries et des pathogènes. À l'extérieur de la lamina propria se retrouve la muscularis mucosae. C'est une couche de cellules musculaires lisses permettant des mouvements locaux de la muqueuse. Directement adjacente à la muqueuse se retrouve la sous-muqueuse. La sous-muqueuse est un tissu conjonctif aréolaire. Celle-ci possède un nombre élevé de vaisseaux sanguins, de vaisseaux lymphatiques, de follicules lymphoïdes et de neurofibres qui permettent à au tube digestif de retrouver sa forme initiale suite à l'ingestion d'un repas. La musculature est celle qui entoure la sous-muqueuse. Elle est composée de cellules musculaires lisses et permet et produit la segmentation et le péristaltisme. Finalement, la séreuse est composée de tissu conjonctif lâche aréolaire qui est recouvert de mésothélium. En entourant les organes de l'appareil digestif, la séreuse exerce un rôle de protecteur (Marieb et Hoehn, 2015).

## 1.2 L'intestin grêle

L'intestin grêle est l'organe principal pour la digestion. L'intestin grêle va du muscle sphincter pylorique jusqu'à la valve iléocœcale. L'intestin grêle se divise en trois sections soit : le duodénum, le jéjunum puis l'iléum. Les trois sections sont reconnaissables selon leur structure histologique de leur muqueuse. Pour ce qui est du jéjunum et de l'iléon ceux-ci se ressemblent beaucoup à l'exception de l'iléon qui a un diamètre plus petit et qui est aussi plus court (Marieb et Hoehn, 2015).

De manière microscopique, l'intestin grêle est très adapté à sa fonction d'absorption des nutriments, puisqu'il possède sur ces parois, trois types de modifications structurales. D'abord, les plis cellulaires permettent un ralentissement du chyme, ce qui a pour effet d'augmenter l'absorption des nutriments puisqu'il y a un plus grand contact avec la muqueuse. Ensuite, les villosités intestinales permettent une plus grande distance d'absorption des nutriments puisque les villosités intestinales sont une continuité de la muqueuse. Il y a donc une augmentation de la surface de contact avec les nutriments. Finalement, les microvillosités qui forment la bordure en brosse de l'intestin. La membrane plasmique des microvillosités est également formée de

glycocalyx où sont localisées les enzymes de la bordure en brosse ; c'est ce qui permet la dernière étape pour la digestion des glucides et des protéines (Marieb et Hoehn, 2015).

### 1.2.1 L'épithélium intestinal

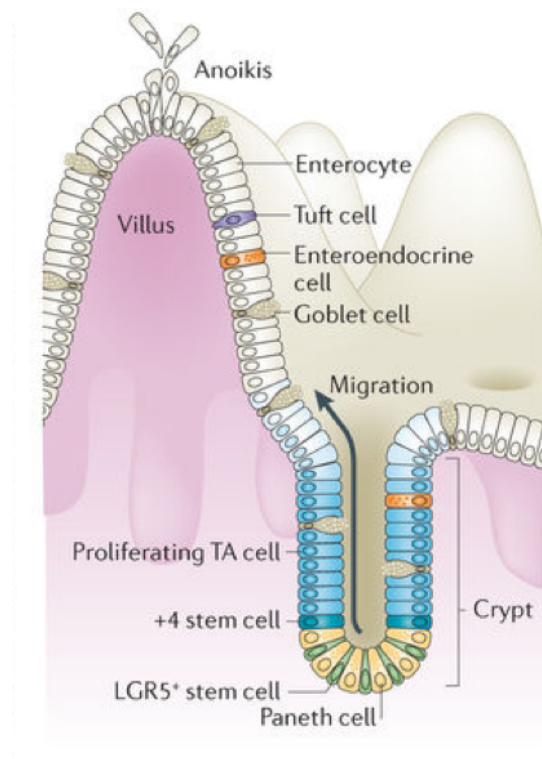
L'épithélium intestinal est organisé sous une forme d'axes crypte-villosité. La muqueuse se divise en quatre types de cellules épithéliales différenciées : les entérocytes (ou les cellules absorbantes), les cellules caliciformes, les cellules de Paneth et les cellules entéroendocrines. Au fond des cryptes se retrouve la niche des cellules souches qui permet le maintien des cellules souches dans un environnement optimal et finement contrôlé en facteurs de croissance et protéines de la matrice extracellulaire. Les cellules souches génèrent des populations de progéniteurs dans les cryptes. À l'exclusion des cellules progénitrices déterminées à se différencier en cellules de Paneth qui elles vont migrer vers le bas de la crypte, toutes les autres cellules déterminées à se différencier vont migrer vers le haut de la crypte, arrêter leur prolifération puis se différencier en un des 3 autres types cellulaires. À la sortie de la crypte, les cellules sont pleinement différenciées et vont continuer de migrer jusqu'au sommet des villosités pour être ensuite exfoliées dans la lumière intestinale (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013) (Schéma 1).

Les entérocytes ou les cellules absorbantes sont les cellules responsables de la digestion et de l'absorption des nutriments. Les entérocytes expriment aussi plusieurs enzymes digestives telles que la sucrase-isomaltase et la lactase et sont recouverts de glycocalyx qui les protège contre les agressions mécaniques, chimiques et enzymatiques (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013).

Les cellules à mucus, les cellules caliciformes ou bien les cellules à Gobelet renferment des granules cytoplasmiques qui eux renferment les mucines. Les mucines sont grandement impliquées dans la protection de l'épithélium en formant, lorsque sécrétées un gel ou un mucus qui forme une barrière entre la flore luminale et la muqueuse intestinale. Les cellules à mucus sécrètent aussi les peptides TFF (trefoil factors) qui contrôlent la migration des cellules et stimulent la régénération des muqueuses suite à des agressions bactériennes ou virales ou suite à de l'inflammation (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013).

Les cellules de Paneth sont situées au fond des cryptes de l'intestin grêle et sont absentes du côlon. Elles interagissent avec les cellules souches, jouant un rôle central dans leur maintien et leur prolifération (Clevers and Bevins, 2013). Elles sécrètent aussi des peptides antimicrobiens tels que des défensines ou le lysozyme qui vont contribuer au contrôle de la composition de la flore intestinale et protéger la muqueuse intestinale contre certains pathogènes (Ouellette, 2011).

Les cellules entéroendocrines sécrètent des hormones telles que la sécrétine, la cholécystokinine et la somatostatine qui vont réguler la digestion, la sécrétion biliaire et la sécrétion pancréatique (Zouiten-Mekki *et al.*, 2013).

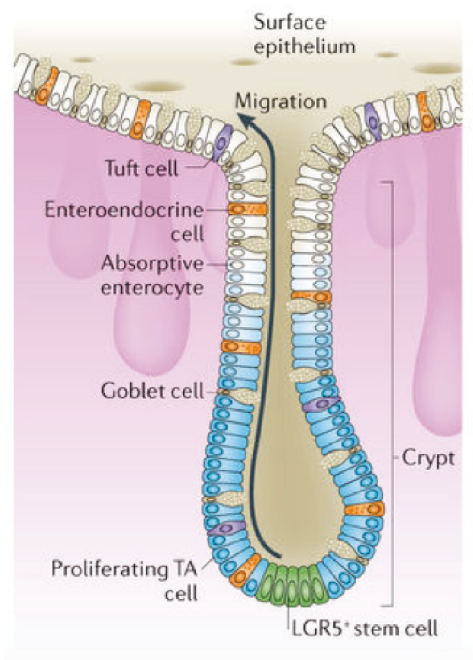


**Schéma 1 : Structure de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle**

L'épithélium de la crypte intestinale contient au fond des cryptes les cellules souches ainsi que les cellules progénitrices et en voie de différenciation. Les cellules différenciées telles que les entérocytes, les cellules caliciformes ou à mucus et les cellules entéroendocrines se retrouvent dans la villosité alors que les cellules de Paneth sont confinées au fond des cryptes, entourant les cellules souches (Tirée de Becker *et al.*, 2013 avec autorisation).

### 1.3 Le côlon

Contrairement à l'intestin grêle, le côlon ne possède pas de villosités, donc il est organisé seulement sous la forme de cryptes. Le côlon ne possède que deux types de cellules sécrétrices, soit les cellules caliciformes et les cellules entéroendocrines. Le rôle du côlon dans la digestion est d'absorber l'eau et certaines vitamines ainsi que de maintenir l'équilibre hydrique (Marieb et Hoehn, 2015) (Schéma 2).



#### **Schéma 2 : Structure de l'axe crypte colonique**

Le côlon, contrairement à l'intestin grêle ne possède pas de cellules de Paneth, mais possède des cellules absorbantes, caliciformes et entéroendocrines (Tirée de Becker *et al.*, 2013 avec autorisation).

## **2. Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium intestinal**

### 2.1 La voie Wnt/ $\beta$ -caténine

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine canonique est un régulateur central du développement et de l'homéostasie tissulaire. Dans l'intestin, la signalisation Wnt (Wingless and int-1) est principalement connue comme le principal organisateur de l'identité et de la prolifération des cellules souches épithéliales. Dans l'intestin grêle, l'expression de Wnt3, Wnt6 et Wnt9b est présente dans le fond des cryptes, tandis que dans le côlon, seulement Wnt6 et Wnt9b sont bien détectés (Gregorieff *et al.*, 2005).

La signalisation Wnt est initiée par la liaison des ligands Wnt sécrétés ou liés à la membrane à leurs récepteurs centraux de la famille Frizzled (Fz), ainsi qu'à divers co-récepteurs qui façonnent davantage la réponse cellulaire. Il y a trois voies de signalisation : 1- la signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine ou la voie canonique (initiée par Wnt1, Wnt3A et Wnt8), qui est particulièrement importante pour la prolifération des cellules souches et des progéniteurs dans l'intestin ; 2- la signalisation Wnt/PCP (Planar cell polarity) ou la voie non-canonique (initiée par Wnt4, Wnt5 et Wnt11), qui organise la morphogénèse des tissus au cours du développement ; et 3- la signalisation Wnt/calcium qui contrôle principalement la motilité cellulaire (Van der Flier 2007 ; Koch 2017).

Pour la signalisation de Wnt/ $\beta$ -caténine ou la voie canonique, il y a deux familles de récepteurs distincts qui sont importantes soient : les récepteurs Frizzled (Fz) qui possèdent sept passages transmembranaires et leur co-récepteurs LDL receptor-related proteins 5 et 6 (LRP5 et LRP6) qui possèdent 1 passage transmembranaire (Tamai *et al.*, 2004). Le principal effecteur de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est la  $\beta$ -caténine, une protéine soit liée aux jonctions adhérentes soit libre dans le cytoplasme. La régulation des niveaux d'expression de cette protéine s'effectue grâce à un complexe nommé complexe de dégradation. Le complexe de dégradation est composé de la protéine d'échafaudage axine, de la protéine suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis Coli), de la protéine WTX (Wilms tumor gene on the X-chromosome) et finalement, des

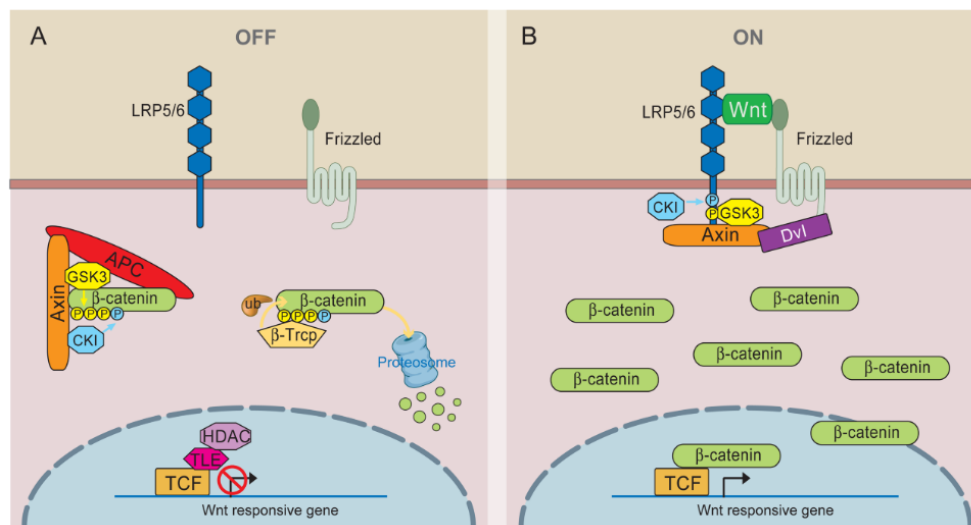
sérine/thréonine kinases CK1 $\alpha/\delta$  (casein kinase 1  $\alpha/\delta$ ) et GSK3 $\alpha/\beta$  (glycogen synthase kinase 3  $\alpha/\beta$ ) (Tamai *et al.*, 2004).

La voie débute par la liaison de Wnt aux récepteurs Frizzled et LRP5/6. Ceux-ci recrutent la protéine Dishevelled (Dsh ou Dvl) qui elle recrute l'axine et la GSK3 qui va d'une part phosphoryler la partie intracellulaire de LRP5/6 et d'autre part, cesser de phosphoryler la  $\beta$ -caténine dans le complexe. L'arrêt de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine lui permet de ne plus être reconnue par  $\beta$ -TrCP, donc conjuguée à l'ubiquitine et donc, de ne plus être dégradée par le protéasome. Il y a donc une stabilisation de la  $\beta$ -caténine qui s'accumule et qui va transloquer vers le noyau pour former un complexe avec les facteurs de transcription TCF/LEF, principalement TCF4 dans l'épithélium intestinal, ce qui a pour effet d'activer les gènes cibles principalement associés au contrôle du cycle cellulaire et de la prolifération (Bryan *et al.*, 2010) (Schéma 3). En absence de Wnt, la  $\beta$ -caténine cytoplasmique, séquestrée par le complexe de dégradation, est phosphorylée par CKI, puis par GSK3. Ces phosphorylations vont mener à son ubiquitination puis sa dégradation dans le protéasome. Dans le noyau, les gènes sont gardés sous silence par un complexe d'inhibition qui possède les protéines LEF1/TCF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) liées au co-represseur Groucho.

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle essentiel de la voie canonique des Wnts dans la prolifération et le renouvellement des cellules de l'épithélium intestinal. Chez la souris, la perte de fonction du facteur de transcription TCF-4 (Korinek *et al.*, 1998) ainsi que l'invalidation conditionnelle de la  $\beta$ -caténine (Ireland *et al.*, 2004) conduit à une perte des cryptes ainsi qu'à la disparition du compartiment prolifératif. De la même façon, l'expression transgénique dans l'épithélium intestinal murin de Dkk-1, qui bloque l'activation de Frizzled par les Wnts, induit la perte des cryptes intestinales chez la souris adulte (Pinto *et al.*, 2003 ; Kuhnert *et al.*, 2004). De plus, une étude a démontré que l'invalidation conditionnelle de la  $\beta$ -caténine dans les cellules souches intestinales induit l'arrêt de prolifération et la différenciation subséquente de ces cellules en entérocytes (Fevr *et al.*, 2007).

Paradoxalement, la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est aussi impliquée dans le processus de différenciation cellulaire. En effet, les souris invalidées pour Tcf4 possèdent des cellules caliciformes et des entérocytes, mais ne possèdent pas de cellules de Paneth (Korinek *et al.*, 1998). Cette voie de

signalisation serait principalement impliquée dans la différenciation des cellules de Paneth notamment par l'induction de l'expression du gène cible *Sox9* (SRY (sex determining region Y)-box 9), une protéine nécessaire à la maturation des cellules de Paneth (Mori-Akiyama *et al.*, 2007 ; Bastide *et al.*, 2007).



**Schéma 3 : Voie de signalisation Wnt/β-Caténine**

À gauche, en absence de Wnt, le complexe de dégradation provoque la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, ce qui cause son ubiquitination puis sa dégradation. Il n'y aura donc pas de transcription des gènes cibles qui contrôlent la prolifération. À droite, en présence de Wnt dans le milieu, ceux-ci se lient au complexe récepteur Frizzled/LRP5/6, ce qui provoque la déstabilisation du complexe de dégradation, la stabilisation de la  $\beta$ -caténine et sa translocation au noyau (Tirée de Bryan *et al.*, 2010 avec autorisation).

Pour ce qui est de la voie de signalisation Wnt/PCP (Planar cell polarity) ou la voie non-canonique, elle est dite non-canonique puisqu'elle n'implique pas la  $\beta$ -caténine dans sa signalisation intracellulaire. Dans cette voie, il y a liaison des Wnt non-canoniques avec Frizzled, mais cette voie est indépendante de LRP5/6. Cette voie permet une organisation ordonnée du cytosquelette d'actine conférant ainsi une orientation vectorielle au tissu (Schéma 3) (Alberts *et al.*, 2015).

Finalement pour ce qui est de la voie de signalisation Wnt/calcium, il y a interaction entre Wnt et Frizzled qui médie leur action via l'activation de certaines protéines G qui vont interagir avec

Dishevelled. Il y a par la suite activation de la phospholipase C, ce qui mène à la production de diacylglycérol et d'IP3. Le diacylglycérol va activer les PKC (Protéine kinase C) tandis que l'IP3 va stimuler la relâche du calcium du réticulum endoplasmique. L'activation de cette voie module surtout l'adhésion cellulaire et la motilité (Alberts *et al.*, 2015).

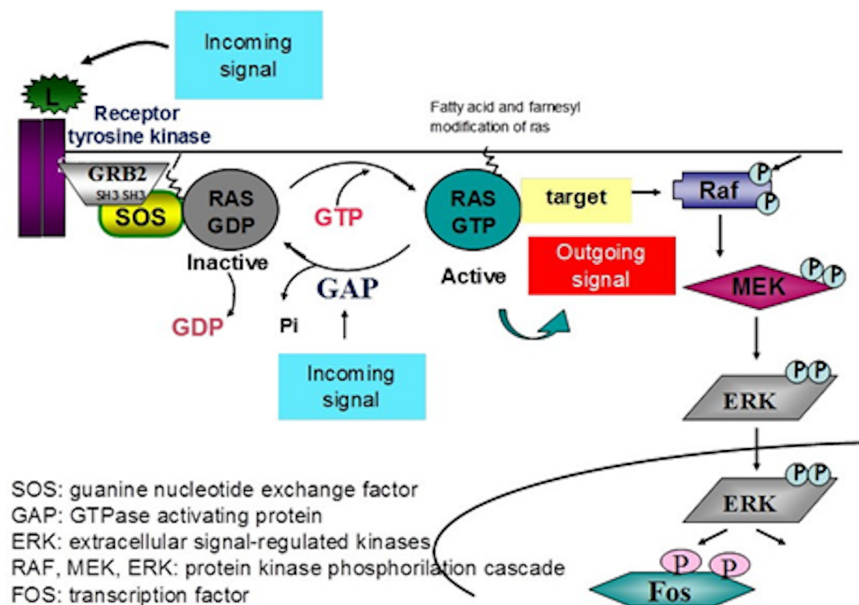
## 2.2 La voie de signalisation RAS/ERK (Extracellular signal-regulated kinase 1/2)/MAPK (Mitogen-activated protein kinases)

La voie de signalisation RAS/ERK est une voie importante puisqu'elle est impliquée dans la régulation de la survie, de la prolifération, de la migration cellulaire et de la différenciation de plusieurs types cellulaires. Cette voie est principalement activée suite à la liaison de facteurs de croissance avec des récepteurs membranaires possédant une activité tyrosine kinase comme par exemple l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). L'activation de ce récepteur permet le recrutement de plusieurs protéines adaptatrices qui ultimement vont mener à l'activation des protéines RAS. RAS est une famille de protéines (NRAS, KRAS, HRAS) qui joue un rôle central dans cette signalisation puisqu'elle possède deux états : un état actif dans laquelle elle est liée au GTP (Guanosine Tri-Phosphate) ce qui permet l'activation de différents effecteurs tels les protéines RAF et PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et un état inactif dans laquelle elle est liée au GDP (Guanosine Di-phosphate). L'activation de la protéine RAS est causée par le déplacement du GDP par du GTP (stimulée les facteurs d'échanges GEF) et son inactivation par l'hydrolyse du GTP en GDP (stimulée par les protéines de régulation GAP (GTPase-Activating Protein) (Schéma 4). L'activation des protéines RAS mène à l'activation et au recrutement des kinases RAF (ARAF, BRAF, CRAF). Les protéines RAF phosphorylent les kinases à double spécificité MEK1/2 qui elles sont responsables de la phosphorylation et de l'activation des sérine/thréonines kinases ERK1/2. Cela va entraîner la translocation des ERK au niveau du noyau où elles phosphorylent des facteurs de transcription régularisant l'expression de gènes impliqués dans la régulation, principalement de la prolifération et de la survie (Cargnello 2011).

De manière intéressante, notre groupe a déjà rapporté que les formes actives de ERK1/2 sont principalement retrouvées dans le noyau des cellules cryptales de l'épithélium intestinal humain (Aliaga *et al.*, 1999). De plus, dans des cellules épithéliales intestinales en culture, notre groupe a démontré que l'activation des ERK est nécessaire à l'entrée des cellules en phase S du cycle



cellulaire induite par le facteur de croissance EGF (Rivard *et al.*, 1999). L'activation de ERK1/2 permet aussi l'induction de la cycline D1, de c-myc (Hollenhorst *et al.*, 2011 ; Murphy & Blenis, 2006) et la translocation nucléaire du facteur de transcription E2F4 (Garneau *et al.*, 2009, Paquin *et al.*, 2013). Finalement, une forte augmentation de la prolifération cellulaire a été observée chez les souris exprimant une forme constitutive active de RAS (KRasG12D) dans les cellules épithéliales intestinales (Feng *et al.*, 2011). Pris ensemble, ces résultats indiquent que l'activation de la signalisation ERK est nécessaire à la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Le laboratoire de la P<sup>re</sup> Rivard a également démontré que l'inhibition des kinases ERK1/2 était nécessaire à l'inhibition de la prolifération et à l'induction de la différenciation des cellules déterminées à se différencier en entérocytes (Aliaga *et al.*, 1999 ; Lemieux *et al.*, 2011).



#### Schéma 4 : Activation et inactivation de la protéine RAS

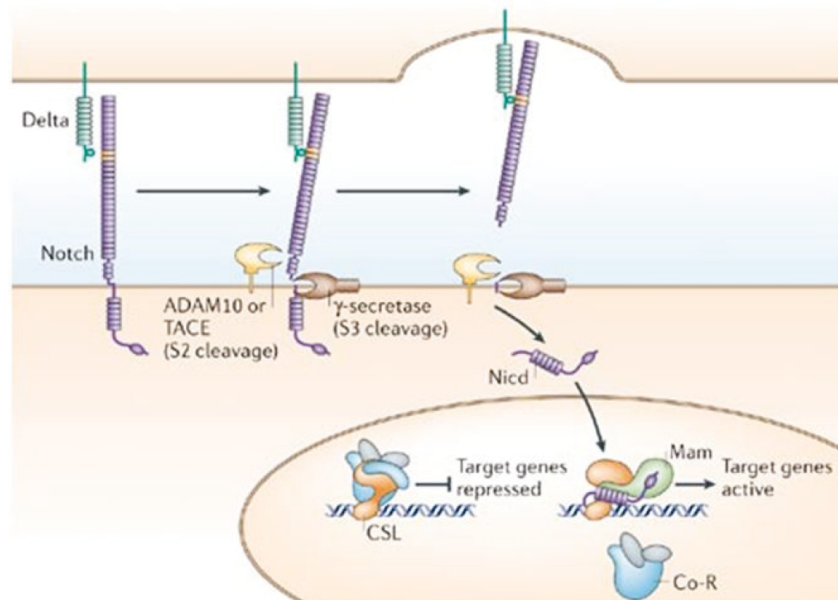
L'entrée dans un cycle cellulaire se produit lorsque la cellule est exposée aux mitogènes. Cet événement active les domaines kinasiques des récepteurs, provoquant la phosphorylation de plusieurs résidus sur tyrosine générant ainsi de nouveaux sites de liaison qui recrutent des protéines de signalisation intracellulaires comme Grb2, qui se lie ensuite la protéine SOS. Ras peut exister dans un état inactif lié au GDP ou dans un état actif lié au GTP. Ras favorise la division cellulaire par la stimulation d'une cascade de MAP kinase. La première kinase de cette cascade,

Raf, est activée au niveau de la membrane cellulaire en se liant à Ras activé. Raf phosphoryle et active la deuxième kinase, MEK, qui active alors la troisième kinase, ERK (MAP kinase). ERK relaye le signal mitogène vers le noyau, où il phosphoryle de multiples cibles, y compris les protéines régulatrices de gènes qui sont activées par la phosphorylation et induisent l'expression d'un ensemble de gènes qui sont appelés les gènes précoces immédiats (Tirée de Balajthy *et al.*, 2011 avec autorisation).

### 2.3 La voie de signalisation Notch

La signalisation Notch est induite par la liaison d'un ligand de la famille Delta-Like ou bien Jagged. Il y a donc interaction entre un récepteur (Notch) présent sur la cellule réceptrice et les ligands de la cellule émettrice. En effet, les ligands Notch sont transmembranaires. L'interaction d'un récepteur Notch avec un ligand entraîne un premier clivage qui est fait par une métalloprotéase de la famille ADAM (a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein). Par la suite, il y a aura un deuxième clivage qui sera exercé par une  $\gamma$ -sécrétase. Ce clivage permettra de libérer la partie intracellulaire du récepteur Notch, NICD (Notch intracellular domain). Ce peptide peut alors transloquer au noyau et interagir avec RBPJ (recombining binding protein suppressor of hairless) et son co-activateur Mastermind (Schéma 5). La famille de gènes activés par la voie Notch la plus connue est la famille Hes (Hairy enhancer of split). La famille Hes est composée Hes1, Hes5 et Hes7 qui sont des répresseurs transcriptionnels (Fischer et Gessler, 2007).

Dans l'épithélium intestinal, la voie de signalisation Notch joue un rôle important dans la prolifération des cellules souches et dans la différenciation des cellules absorbantes. Il a été démontré que la voie de Notch est impliquée dans le maintien du compartiment prolifératif et est très active dans les cellules souches de l'épithélium intestinal (Van DEN *et al.*, 2001). L'inhibition de la signalisation de Notch chez la souris par l'inhibition de la  $\gamma$ -sécrétase, entraîne un arrêt de la prolifération et l'induction de la différenciation en cellules sécrétrices (Van ES *et al.*, 2005). Inversement, l'activation constitutive de Notch cause la perte des cellules sécrétrices ainsi qu'une augmentation de la prolifération cellulaire (Fre *et al.*, 2005). De plus, Notch promeut la différenciation des cellules absorbantes via les facteurs HES qui inhibent l'expression de Math1, un facteur nécessaire à la différenciation des cellules de la lignée sécrétrice (Sancho *et al.*, 2015). Ainsi, la voie de signalisation de Notch est impliquée dans la régulation des processus de prolifération/différenciation et de détermination des cellules de l'épithélium intestinal.



### Schéma 5 : Voie de signalisation Notch

L'activation de la signalisation Notch débute par la liaison d'un ligand, par exemple Delta-Like, avec Notch. Après la liaison entre le récepteur et son ligand, il y a un premier clivage qui est fait par une métalloprotéase de la famille ADAM, tel qu'ADAM 10. Il y a aura un deuxième clivage qui sera exercé par une  $\gamma$ -sécrétase. Ce clivage permettra de libérer le fragment intracellulaire du récepteur, NIC. Ce fragment transloque par la suite au noyau et une fois au noyau, il y a transcription des gènes cibles de la voie Notch comme par exemple les facteurs de la famille HES (Tirée de Bray *et al.*, 2006 avec autorisation).

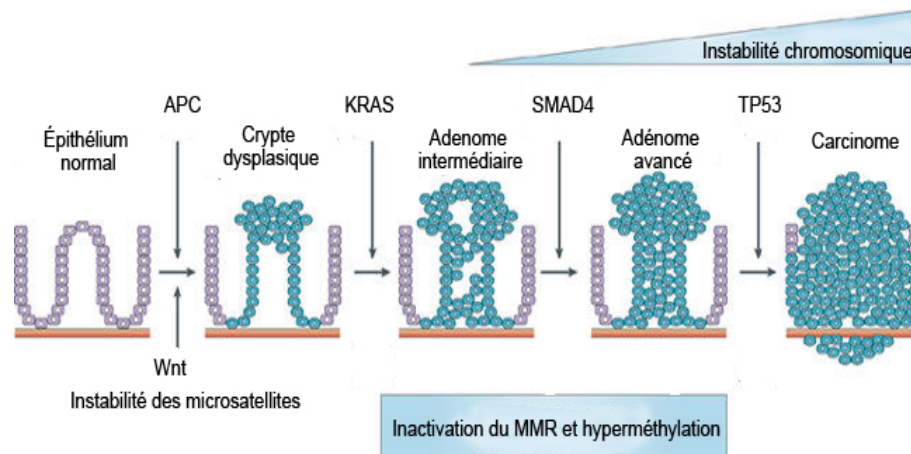
### 3. Cancer colorectal

Les cancers colorectaux sont parmi les cancers les plus diagnostiqués au Canada chaque année. 80% des cancers colorectaux se manifestent de façon sporadique (Kinzler & Vogelstein, 1991 ; Jass, 2002 ; Worthley *et al.*, 2007). Par contre, environ 20 % des personnes atteintes d'un cancer colorectal ont des antécédents familiaux. Parmi les cancers colorectaux d'origine génétique, on retrouve la polypose adénomateuse familiale (PAF) (Grodin *et al.*, 1991 ; Kinzler *et al.*, 1991). Cette maladie est autosomale dominante, héréditaire et dont la pénétrance est complète. Le gène *APC* qui est un gène suppresseur de tumeur est muté, ce qui est à l'origine de la polypose. Cette mutation siège sur le bras long du chromosome 5. La mutation d'*APC* amène une déstabilisation

du complexe de dégradation, ce qui résulte en la stabilisation subséquente de la  $\beta$ -caténine. La présence constitutive de hauts niveaux de  $\beta$ -caténine mène à une hyperprolifération cellulaire et à la formation d'adénomes. Une autre forme de cancer colorectal héréditaire est le syndrome de Lynch qui est un syndrome de transmission autosomale dominante due à une mutation d'un des gènes du système de réparation de l'ADN (Mismatch repair) principalement *MLH1* (MutL homolog 1), *MSH2* (mutS protein homolog 2), *MSH6* (mutS homolog 6) et *PMS2* (Postmeiotic Segregation Increased 2) (Lynch et de la Chapelle, 2003 ; Arnold *et al.*, 2005).

### 3.1 Cancer colorectal sporadique

La formation d'un cancer colorectal sporadique débute par une première transformation histologique de l'épithélium en foyers de cryptes aberrantes et en adénomes. Par la suite, ces adénomes peuvent continuer de se développer et évoluer en adénocarcinomes puis ultimement en adénocarcinomes invasifs menant à des métastases. Trois voies moléculaires principales menant au développement d'un cancer colorectal ont été décrites : 1- L'instabilité des microsatellites (MSI), 2- l'instabilité chromosomique (CIN) et 3- la méthylation des îlots CpG (CIMP) (Pino et Chung, 2010) (Schéma 6).



**Schéma 6 : Schéma de la cascade de carcinogénèse**

La carcinogénèse colorectale implique la transformation de l'épithélium en adénomes qui est associée à la perte de fonction d'APC. Par la suite, la mutation dans l'oncogène *KRAS* favorise le développement de ces adénomes en adénomes intermédiaires qui pourront évoluer en carcinomes suite aux mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs *SMAD4* et *TP53* (Tirée de Walther *et al.*, 2009 avec autorisation).

Tout d'abord, l'instabilité microsatellite (MSI) est due à une défaillance dans le système de réparation des mésappariements soit le système MMR (MisMatch Repair). Ce système implique les gènes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* et *PMS2* et cette voie débute donc, lorsqu'il y a une mutation d'un de ces gènes. Une mutation dans ces gènes va apporter un mauvais fonctionnement du système de réparation. En plus, il y a aussi la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur *APC* qui contribue à l'instabilité des microsatellites (Armaghany *et al.*, 2012). Ensuite, l'instabilité chromosomique (CIN) est en fait un phénomène qui se passe selon une perte ou bien un gain de chromosomes dus à des remaniements structuraux des chromosomes (Vogelstein *et al.*, 1998). Cette voie débute par la perte du gène *APC* suivie des mutations des gènes *KRAS* et *TP53*. Finalement, la voie CIMP ou méthylation des îlots CpG débute généralement avec une mutation activatrice dans le gène *BRAF* et la méthylation de l'ADN dans des régions promotrices des gènes suppresseurs de tumeurs. Cette méthylation a pour effet de rendre silencieuse ces régions au niveau de l'expression génique (Mundade *et al.*, 2014) (Schéma 7).

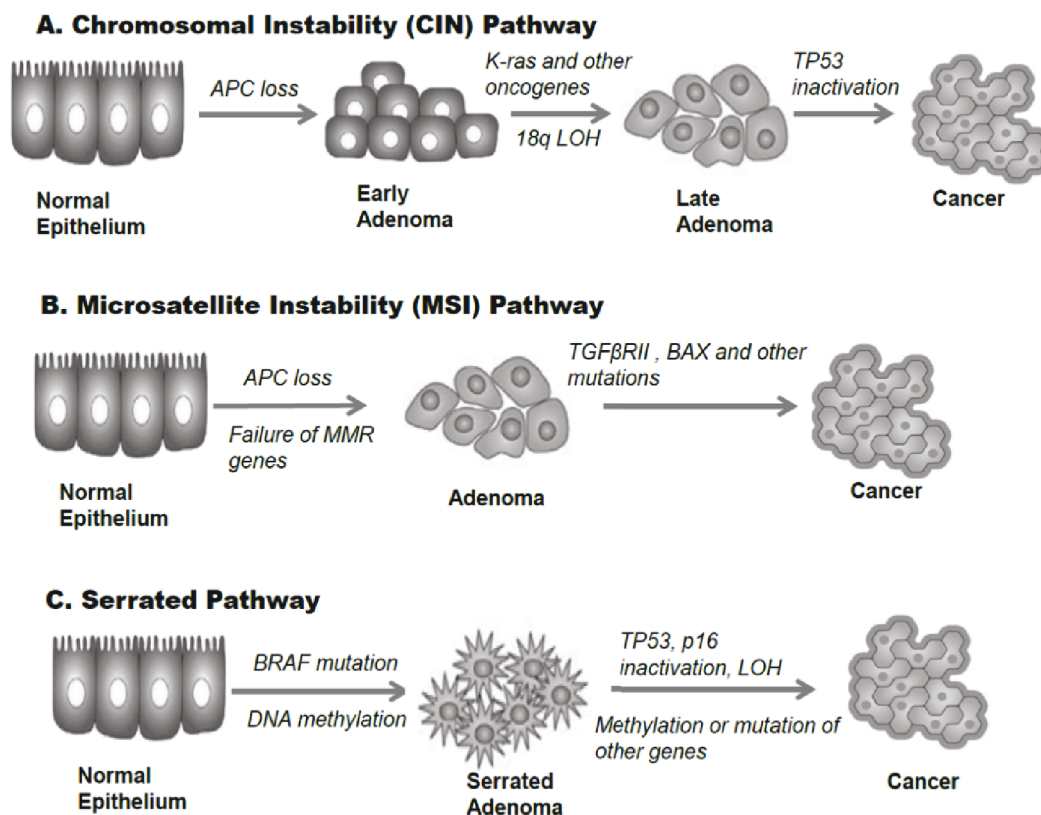


Schéma 7 : Les voies moléculaires de carcinogénèse colorectale

Trois voies moléculaires principales menant au développement d'un cancer colorectal ont été décrites : la voie de l'instabilité des microsatellites (MSI), la voie de l'instabilité chromosomique (CIN) et la voie de la méthylation des îlots CpG (CIMP) (Tirée de Mundade *et al.*, 2014 avec autorisation).

#### **4. Le cycle cellulaire**

Comme l'ensemble du tissu intestinal se renouvelle continuellement, cela implique un grand nombre de divisions cellulaires et donc, un risque non négligeable de voir apparaître des altérations génétiques. Cette rapidité du renouvellement du tissu intestinal ainsi que l'exposition aux substances toxiques, par l'alimentation notamment, pourraient expliquer la fréquence élevée du cancer colorectal. Le cancer colorectal origine donc, au départ, d'une perte de contrôle du cycle cellulaire.

##### 4.1 Les phases du cycle cellulaire

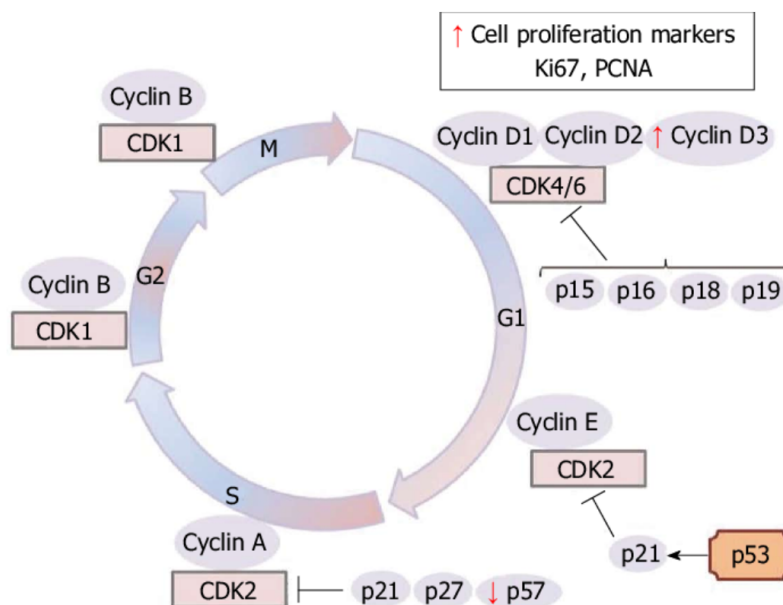
Le cycle cellulaire se divise en phases soit les phases G0 (G pour GAP), G1, S (S pour synthèse ADN), G2 et M (M pour Mitose). La phase G0 constitue une phase de quiescence cellulaire. Pour que les cellules quittent la quiescence cellulaire celles-ci doivent recevoir des signaux des facteurs de croissance pour pouvoir entrer dans le cycle cellulaire. C'est à ce moment qu'elles entrent en phase G1. Lors de la phase G1, les cellules doublent leur contenu protéique, ce qui leur permet d'entrer par la suite en phase S durant laquelle elles vont répliquer leur ADN. Une fois la phase S complétée, les cellules vont entrer en phase G2, une phase de préparation à la mitose et pendant laquelle on observe une condensation de la chromatine en chromosomes. Finalement, les cellules poursuivent en phase M qui est la phase de la division cellulaire. Dans cette phase, il y a aussi alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale et leur séparation (Alberts *et al.*, 2014) (Schéma 8).

##### 4.2 La progression du cycle cellulaire

Deux familles principales régulent la progression du cycle cellulaire : les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK) (Alberts *et al.*, 2014). L'assemblage coordonné des complexes cycline/CDK va conditionner la progression des différentes phases du cycle cellulaire.

Donc, en réponses à une stimulation par les facteurs de croissances, les cellules vont quitter la

quiescence cellulaire et entrer en phase G1. Un des premiers marqueurs du cycle cellulaire qui est induit est la cycline D1. La hausse d'expression de la cycline D1 va lui permettre de se lier à CDK4 et/ou CDK6. Après phosphorylation, ces complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6 vont phosphoryler pRb, ce qui va permettre la libération des facteurs de transcription E2F, des facteurs nécessaires à l'expression de protéines nécessaires à la réplication de l'ADN (Sherr, 1996). De façon concomitante, l'expression de l'inhibiteur p27, élevée pendant la quiescence, chute due à sa dégradation dans le protéasome. Cette diminution de p27 facilite l'activation des complexes cycline D/CDK4 et cycline D/CDK6, puis du complexe cycline D/CDK2, nécessaire à la progression de la phase S (Harbour *et al.*, 1999).



**Schéma 8 : Représentation du cycle cellulaire et de ses protéines régulatrices**

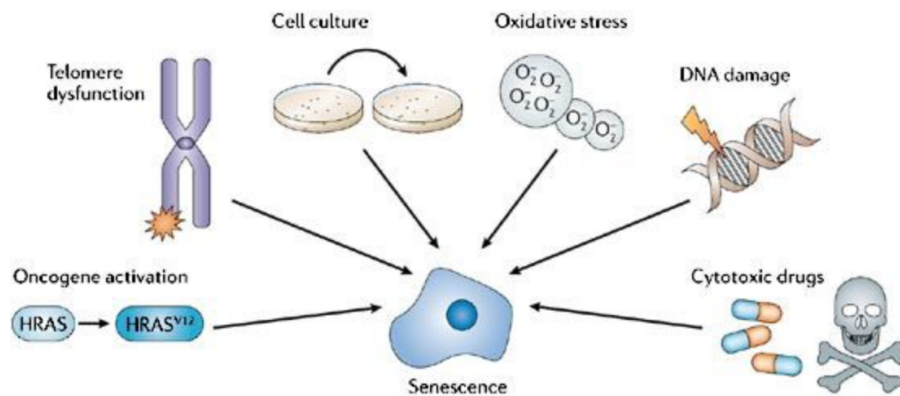
La progression de chacune des phases du cycle cellulaire est dépendante de l'activation de complexes cycline/CDK spécifiques, contrôlée principalement par l'expression des cyclines à des moments précis du cycle. L'activation des complexes cycline/CDK est aussi finement régulée par des protéines inhibitrices appelées inhibiteurs du cycle cellulaire appartenant à deux familles : la famille INK (inhibitory kinase) comprenant p15, p16, p18 et p19 et la famille Cip/Kip (CDK inhibitory protein/kinase inhibitory protein) comprenant p21, p27 et p57 (Tirée de Santos *et al.*, 2015 ; Alberts *et al.*, 2014 avec autorisation).

### 4.3 La sénescence cellulaire

En 1961, Hayflick a été l'un des premiers à démontrer le phénomène de sénescence. Il l'a observé *in vitro* sur des cellules en culture suite à un certain nombre de divisions (Evan *et al.*, 2009). Ce qu'il a observé en fait, c'est la sénescence dite répllicative, c'est-à-dire un état cellulaire que les cellules atteignent après un nombre maximal de divisions cellulaires. La sénescence répllicative est observée lors du vieillissement, puisque les télomères vont se raccourcir au fur et à mesure des divisions cellulaires. À chaque division, il y a une diminution de la longueur des télomères aux extrémités des chromosomes. Lorsqu'ils sont très courts, la cellule va percevoir cela comme un stress similaire à celui des dommages à l'ADN, ce qui va entraîner une signalisation spécifique impliquant les kinases ATM/ATR. L'activation de ces kinases mène à la phosphorylation et à la stabilisation de p53. p53 est un facteur de transcription qui augmente l'expression de plusieurs gènes dont p21, un inhibiteur du cycle cellulaire capable de lier et d'inhiber la plupart des complexes cycline/CDK et donc, la progression du cycle cellulaire (Campisi *et al.*, 2007 ; Nardella *et al.*, 2011). Une deuxième voie est aussi impliquée dans la sénescence répllicative soit celle dépendante de l'augmentation de p16 (INK4), un inhibiteur du cycle cellulaire capable de bloquer CDK4 et CDK6, associées aux cyclines D. Quand ces kinases sont inhibées, il n'y a plus de phosphorylation du rétinoblastome (Rb) ce qui inhibe le cycle cellulaire en phase G0/G1. L'augmentation d'expression concomitante de plusieurs inhibiteurs du cycle cellulaire verrouille donc le cycle cellulaire et provoque l'entrée en sénescence (Nardella *et al.*, 2011). À noter, les cellules sénescents ne sont pas des cellules mortes mais sont métaboliquement actives et peuvent survivre longtemps.

La sénescence a été considérée comme une barrière physiologique contre l'initiation et la progression tumorale. En effet, elle peut être aussi déclenchée par l'activation d'oncogènes ou la perte de gènes suppresseurs de tumeurs (Qian *et al.*, 2010) dans un processus appelé sénescence oncogénique (Collado *et al.*, 2006) ou bien elle peut être activée par des dommages à l'ADN ou un stress oxydatif prolongé (Nardella *et al.*, 2011 ; Meng *et al.*, 2015) (Schéma 9).





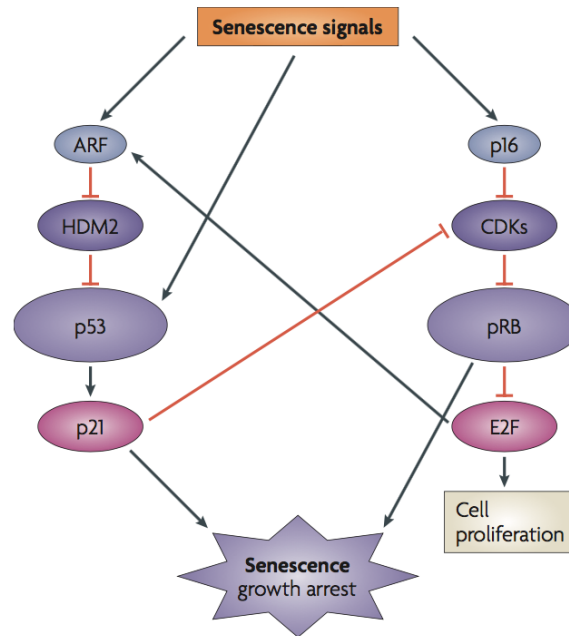
### Schéma 9 : Inducteurs de la sénescence

La sénescence cellulaire peut être induite par le raccourcissement des télomères, suite à l'expression d'oncogènes, suite à des dommages à l'ADN, suite à un stress oxydatif ou suite à l'exposition à certaines drogues comme la chimiothérapie (Tirée de Collado *et al.*, 2006 avec autorisation).

Plusieurs études ont étudié les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de ces types de sénescence. Les protéines suppressives de tumeurs p53 et la protéine du rétinoblastome (pRb) (Schéma 10) ont été identifiées comme des facteurs clés de l'induction de ces types de sénescence. Lors d'une stimulation oncogénique, l'expression de la protéine ARF est alors augmentée (via c-MYC ou E2F1 notamment) (Abida *et al.*, 2008 ; Gu *et al.*, 2008). ARF se lie alors à Mdm2 (mouse double minute 2), ce qui libère p53 et permet de le stabiliser (Campisi *et al.*, 2007 ; Collado *et al.*, 2007). p53 active alors l'expression de ses gènes cibles dont p21, ce qui provoque l'arrêt du cycle cellulaire. Dans certaines situations, c'est la voie de pRb qui est particulièrement stimulée via l'augmentation d'expression de la protéine p16. Cette augmentation fait en sorte qu'il y a diminution de l'activité des CDK4 et CDK6 conduisant conséquemment à une diminution de la phosphorylation de pRb et donc à une baisse de la libération des E2F, ce qui contribue à l'inhibition du cycle cellulaire (Campisi *et al.*, 2007).

D'un point de vue signalisation, il est bien connu que l'expression de l'oncogène RAS mène à l'hyperprolifération via l'activation des kinases ERK. Cette hyperprolifération provoque l'augmentation de la production de ROS qui sont des dérivés réactifs d'oxygène. Une production très élevée et incontrôlée des ROS cause des dommages à l'ADN. L'accumulation de dommages à l'ADN résulte en l'activation des kinases ATM/ATR, ce qui mène à la phosphorylation puis à la

stabilisation de p53 et à l'augmentation de p21 entraînant un arrêt du cycle cellulaire. En parallèle, une autre voie est souvent activée soit celle impliquant la phosphorylation de ETS2, un facteur de transcription qui augmente l'expression p16, ce qui bloque CDK4 et CDK6 et donc la phosphorylation de pRb. Cette sénescence prématurée permet de protéger les cellules normales contre un stress oncogénique et représente donc une barrière à la transformation cellulaire (Nardella *et al.*, 2011).

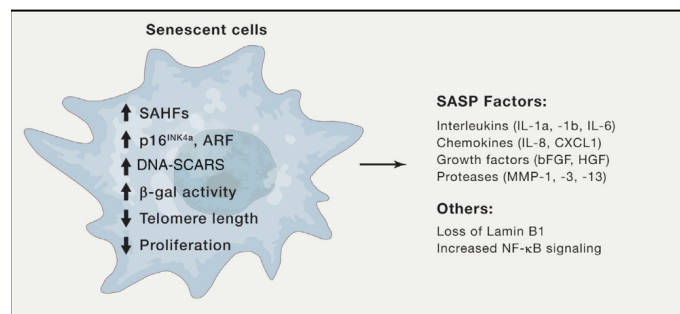


#### Schéma 10 : Voies classiques menant à la sénescence cellulaire

La sénescence cellulaire peut-être induite par l'activation de deux voies soient celle de p53 et celle de p16/pRb (Tirée de Campisi *et al.*, 2007 avec autorisation).

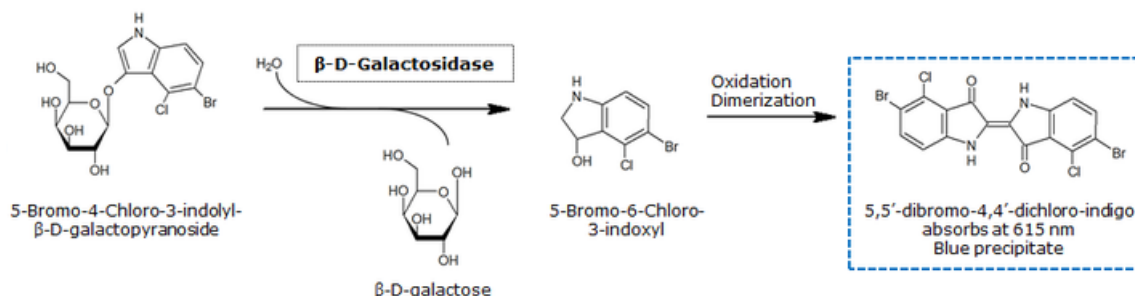
Les cellules sénescences acquièrent souvent un phénotype dit sécrétoire (senescence associated secretory phenotype ou SASP) car elles sécrètent plusieurs facteurs comme des cytokines (IL-6 et IL-8 le plus souvent) dans le milieu extracellulaire, modifiant ainsi leur environnement (Demaria *et al.*, 2017). Le SASP agit de façon autocrine, puisqu'il renforce l'état sénescence de la cellule ; de plus, il agit aussi de manière paracrine en stimulant une réponse inflammatoire et/ou migratoire. Le SASP se développe tranquillement sur une plus longue période de temps. Récemment, l'activation du facteur de transcription GATA4 a été décrite pour réguler le SASP et ce via l'activation du NFκB (Kang *et al.*, 2015).

Les cellules sénescences acquièrent également certaines caractéristiques phénotypiques telles qu'une augmentation du volume cellulaire et nucléaire, une modification de l'organisation nucléaire (morphologie plate, hétérochromatine réarrangée), une accumulation de lysosomes, une altération de la fonction autophagique, une augmentation de la quantité de mitochondries, une altération du cytosquelette ainsi qu'une modification du profil d'expression de certains gènes atypiques comme celui de la  $\beta$ -galactosidase acide lysosomale (pH=6). Le marquage de cette  $\beta$ -galactosidase est d'ailleurs utilisé couramment en laboratoire pour détecter et dénombrer les cellules sénescences (Salama *et al.*, 2014) (Schéma 11).



**Schéma 11 : Caractéristiques des cellules sénescences**

Les cellules sénescences se distinguent des cellules saines de plusieurs façons : par exemple, par l'augmentation de la protéine p16, de la  $\beta$ -galactosidase lysosomale, de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ou bien par un blocage de la prolifération (Tirée de He *et al.*, 2017 avec autorisation).



**Schéma 12 : Détection de l'expression de la  $\beta$ -Galactosidase associée à la sénescence cellulaire**

La  $\beta$ -D-galactosidase acide est une hydrolase eucariotique localisée dans les lysosomes dont le

rôle est d'hydrolyser des  $\beta$ -D-galactoses, libérant la partie indolique. La partie indolique par oxydation forme ensuite un composé bleu insoluble dans l'eau. Des ions  $K^+$  ainsi que des ions  $Mg^{2+}$  sont nécessaires pour obtenir une action optimale de l'enzyme. La liaison covalente au substrat se fait par le groupe carboxyl terminal de la chaîne latérale d'un acide glutamique (Tirée de Dimri *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 2006 avec autorisation).

Un autre moyen de détecter la sénescence est par le suivi des modifications chromatiniques. Ce sont des modifications épigénétiques qui vont entraîner la réorganisation de la chromatine. Cette réorganisation va apporter un changement de la composition des histones. Il va y avoir formation de foyers d'hétérochromatine (SAHF) qui est une structure formée de nombreuses protéines signalant les lésions de l'ADN. De plus, la perte de la lamine B1 est aussi observée dans les cellules sénescences ce qui constitue aussi événement clé de la réorganisation de la chromatine pendant la sénescence cellulaire (Salama *et al.*, 2014).

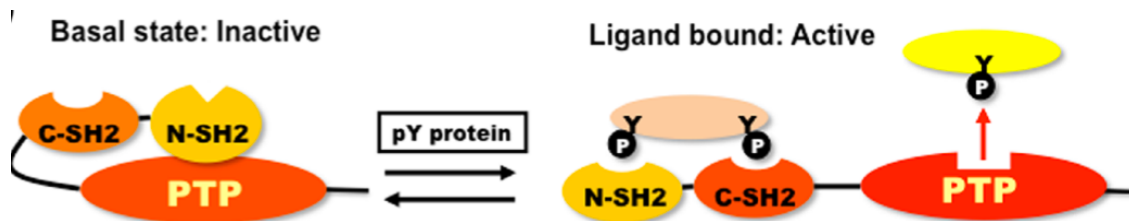
D'autres gènes sont impliqués dans la sénescence. Tout d'abord, le gène de la leucémie promyélocytaire (PML), un gène suppresseur de tumeur. Ce gène code pour une phosphoprotéine nucléaire qui a été identifiée chez les patients atteints de leucémie promyélocytaire aiguë (APL). Le niveau de PML est augmenté lors de la sénescence répllicative oncogénique induite par l'oncogène Ras. La surexpression de la PML est d'ailleurs suffisante pour induire une sénescence prématurée via l'activation de p53, due à son acétylation sur la Lys-382 et sa phosphorylation sur les sérines 15 et 46. De plus, PML est capable d'augmenter la stabilité de p53 en séquestrant Mdm2. Paradoxalement, PML est une cible directe de p53 et fonctionne comme un effecteur pour les activités p53. En réponse à une activation oncogénique et aux dommages à l'ADN, l'induction de PML dépend donc de p53. Ainsi, PML et p53 forment une boucle de rétroaction positive contribuant à la sénescence cellulaire (Qian & Chen 2010). Ce gène est aussi impliqué dans l'apoptose en induisant l'activation de la caspase 3 et de plusieurs voies apoptotiques en réponse à divers stimuli comme l'irradiation, le  $TNF\alpha$ , l'activation de Fas, l'interféron de type I et II (INFs) et les céramides. L'apoptose induite en réponse à l'irradiation et l'activation de Fas est atténuée chez les souris et cellules knock-out pour Pml, ce qui indique que l'activation médiée par Pml de la caspase 3 est essentielle pour l'apoptose. Cependant, PML peut également recruter BAX et p27KIP1 aux PML-NB et ainsi médier l'apoptose indépendamment de l'activation de la caspase 3. En résumé, la PML médie l'apoptose via les deux voies dépendantes et indépendantes de la caspase 3 (Quignon, 1998 et Wang 1998).

Ensuite, il y a le marqueur PAI-1, l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène-1, qui est aussi régulé positivement dans les fibroblastes vieillissants *in vivo* et *in vitro*. De plus, PAI-1 est considéré comme un marqueur de la sénescence répllicative. PAI-1 inhibe la prolifération cellulaire parce qu'il s'associe avec l'uPA, inhibant son activité protéasique, ce qui favorise la progression du cycle cellulaire. D'ailleurs, PAI-1 est une cible critique en aval de p53 dans la réponse à la sénescence des fibroblastes diploïdes à la fois chez les cellules de souris et humaines (Qian & Chen 2010 ; Kuilman *et al.*, 2009).

## **5. La phosphatase SHP-2, un régulateur important de la cellule**

### 5.1 Généralités

SHP-1 ou PTPN6 (ou SH-PTP1, PTP1C, HCP et SHP) et SHP-2 ou PTPN11 (ou SH-PTP2, PTP1D, Syp, PTP2C et SHPTP-3) sont des protéines tyrosines phosphatases non transmembranaires possédant une homologie de près de 60%. Ces phosphatases possèdent un domaine catalytique PTP, deux domaines SH2 (Src homology 2) en tandem (domaines N-SH2 et C-SH2) et une queue C-terminale. Ces phosphatases détiennent aussi deux sites principaux de phosphorylation sur tyrosine (Y536 et Y564 pour SHP-1 ; Y542 et Y580 pour SHP-2) dans leur queue C-terminale (Zhang *et al.*, 2015). SHP-1 est principalement exprimée dans les cellules d'origine hématopoïétique alors que SHP-2 est plutôt exprimée de manière ubiquiste. Le mécanisme d'activation de ces phosphatases est finement contrôlé par une auto-inhibition. Par exemple, pour SHP-2, à l'état basal, cette phosphatase se retrouve dans une conformation inactive, c'est-à-dire qu'il y a une interaction entre le domaine N-SH2, dont les résidus D61 et E76, et le domaine phosphatasique bloquant ainsi l'accès des substrats au site actif. La liaison de protéines phosphorylées sur tyrosine avec le domaine N-SH2 entraîne un changement de conformation levant l'interaction intramoléculaire entre le domaine N-SH2 et le domaine phosphatasique. La phosphatase se retrouve donc sous une forme active, puis le domaine N-SH2 et le domaine phosphatasique ne sont plus liés (Qiu *et al.*, 2014) (Schéma 13). SHP-2 est principalement localisée au niveau du cytoplasme des cellules, puisque la protéine SHP-2 ne possède pas de séquence de localisation nucléaire (Poole & Jones, 2005)



**Schéma 13 : Conformations de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2**

À l'état basal, SHP-2 se retrouve dans une conformation inactive, c'est-à-dire qu'il y a une interaction entre le domaine N-SH2 et le domaine phosphatasique bloquant ainsi l'accès des substrats au site actif. La liaison de protéines phosphorylées sur tyrosine avec le domaine N-SH2 entraîne un changement de conformation levant l'interaction intramoléculaire entre le domaine N-SH2 et le domaine phosphatasique. La phosphatase se retrouve donc sous une forme active (Tirée de Qiu *et al.*, 2014 avec autorisation).

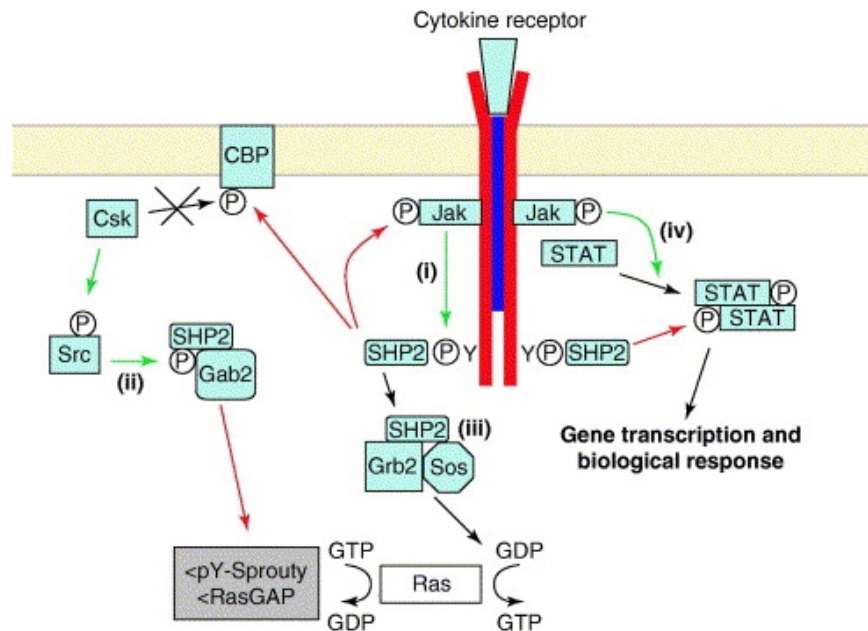
## 5.2 Signalisation régulée par SHP-2

SHP-2 est une protéine connue pour réguler de manière positive et négative des voies de signalisation intracellulaire importantes dans la cellule. Par exemple, le niveau d'activation des voies RAS/ERK, JAK/STAT et PI3K/AKT en réponse aux facteurs de croissance ou aux cytokines est souvent contrôlé par SHP-2 (Araki *et al.*, 2003 ; Tajan *et al.*, 2015 ; Coulombe *et al.*, 2016). De plus, cette phosphatase peut réguler de deux manières différentes la signalisation cellulaire soit en déphosphorylant sur tyrosine ses effecteurs ou bien en agissant comme une protéine adaptatrice via un domaine SH2 (Araki *et al.*, 2003).

### *5.2.1 Voie de RAS/ERK*

Une des principales voies de signalisation régulées par SHP-2 est la voie RAS/ERK. La régulation faite par SHP-2 dans cette voie est qu'elle va déphosphoryler des effecteurs spécifiques de cette voie. Par exemple, SHP-2 peut déphosphoryler la tyrosine responsable de la liaison de la protéine RASGAP sur les récepteurs tyrosines kinases ou sur la protéine adaptatrice Gab1 inhibant le recrutement p120RasGAP, une protéine qui active l'activité GTPasique de RAS (Dance, 2007). Les effecteurs en aval, notamment les kinases RAF/MEK/ERK1/2 sont alors activées et pourront moduler divers processus cellulaires comme la prolifération et la migration (Coulombe *et al.*,

2015) (Schéma 14). D'autres cibles de SHP-2 capables de moduler la voie ERK ont aussi été démontrées dans des contextes cellulaires spécifiques : les protéines Sprouty chez la drosophile, la protéine d'échafaudage IRS-1 dans les cellules vasculaires et les adaptateurs Gab1/2 dans les lymphocytes (Saimond et Alexander, 2006).



**Schéma 14 : Régulation de la voie de signalisation RAS/ERK et de la voie de signalisation JAK/STAT par SHP-2.**

SHP-2 est capable d'inhiber l'activation de la voie JAK/STAT en déphosphorylant directement soit les kinases JAK ou les facteurs de transcription STAT suite à la liaison des cytokines aux récepteurs et SHP-2 pourrait réguler positivement l'activation des voies ERK Ras (Tirée de Salmond and Alexander, 2006 avec autorisation).

### 5.2.2 Voie de JAK/STAT

Les protéines STAT (Signal transducers and activators of transcription) peuvent être soit des transmetteurs du signal ou des activateurs transcriptionnels. Leurs signaux d'activation sont des cytokines qui se lient à leurs récepteurs, ce qui entraîne leur dimérisation et l'activation des kinases JAK. Ces kinases phosphorylent alors les protéines STAT provoquant leur dimérisation et

leur translocation nucléaire. Une fois au noyau, elles stimulent la transcription de gènes cibles associées à la prolifération, à la survie et/ou à la réponse pro-inflammatoire (Coulombe *et al.*, 2015). Dans certains contextes, la phosphatase SHP-2 inhibe la signalisation JAK/STAT en déphosphorylant les STAT comme lors de la réponse à l'interféron alpha et gamma (You *et al.*, 1999). De plus, SHP-2 semble aussi réguler négativement la voie JAK/STAT3 dans les cellules épithéliales intestinales stimulées par l'IL-6 (Coulombe *et al.*, 2013) (Figure 15).

### 5.3 Les pathologies associées à la tyrosine phosphatase SHP-2

De manière intéressante, le gène encodant SHP-2, *PTPN11*, présente des mutations dans certaines maladies humaines, ce qui suggère un rôle important pour cette phosphatase dans le développement de ces pathologies. Toutes les mutations se retrouvent dans la partie N-SH2 et dans le domaine phosphatase de sorte que l'activité de SHP-2 n'est plus régulée par son mécanisme d'auto-inhibition ; ce sont donc des mutations de type gain-de-fonction et les plus connues sont les mutations activatrices E76G et E76K qui causent aussi la plus forte activation phosphatasique. (Zhang *et al.*, 2015 ; Tartaglia *et al.*, 2001 ; Tartaglia *et al.*, 2004).

#### *5.3.1 Syndrome de Noonan*

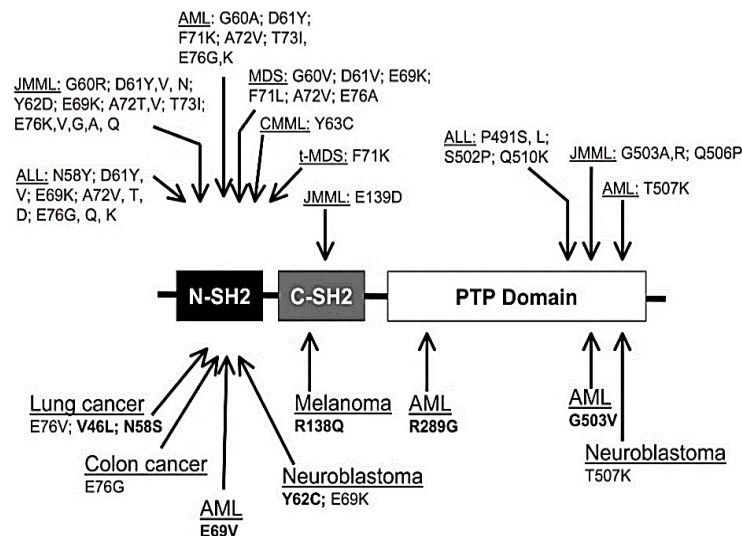
Le syndrome de Noonan est une maladie d'origine génétique avec une transmission autosomale dominante et caractérisée par des problèmes de développement (Turner, 2014). Chez les patients souffrant de ce syndrome, ce sont des mutations activatrices de SHP-2 qui ont été retrouvées (Tartaglia *et al.*, 2001). Ces mutations entraînent une augmentation variable (suivant la mutation) de l'activité phosphatase, prolongeant le signal ERK ce qui amène l'hyperprolifération cellulaire, l'hypertrophie tissulaire et les problèmes développementaux observés chez ces patients (Roberts *et al.*, 2013).

#### *5.3.2 Leucémie et autres cancers*

Le gène *PTPN11* est aussi muté dans plusieurs types de cancers comme les leucémies et d'autres cancers solides. Les mutations sont le plus souvent retrouvées dans le domaine N-SH2 et dans le domaine phosphatasique (Tartaglia *et al.*, 2003). Par exemple, pour les tumeurs solides, il peut s'agir des mélanomes, des neuroblastomes, des cancers du poumon et colorectal. De plus, des polymorphismes dans l'exon 3 ainsi que dans les introns 4, 7 et 9 du gène *PTPN11* ont été rapportés dans d'autres cancers ; toutefois l'impact de ces variantes génétiques n'est pas connu



(Bentires-Alj *et al.*, 2004) (Schéma 15).



### Schéma 15 : Mutations dans le gène *PTPN11*

Liste des mutations activatrices retrouvées dans le gène *PTPN11* dans plusieurs formes de leucémies et d'autres cancers solides (Tirée de Bentires-Alj *et al.*, 2004 avec autorisation).

SHP-2 est reconnue comme un facteur crucial pour le développement des leucémies. Les leucémies sont des cancers qui touchent la moelle osseuse qui elle est responsable de la production des cellules sanguines. Dans les leucémies myélomonocytaires juvéniles (JMML), la formation des cellules myélomonocytaires est dérégulée (Tartaglia *et al.*, 2003). Dans ce type de leucémie, on retrouve les mutations D61Y et E76K dans le gène *PTPN11*. Ces mutations sont localisées dans le domaine N-SH2, sur des résidus interagissant avec le domaine PTP (Tartaglia *et al.*, 2003). Dans la leucémie lymphoblastique aigüe et la leucémie myéloïde aigüe, ce sont des mutations somatiques activatrices de *PTPN11* qui ont été caractérisées (Tartaglia *et al.*, 2004). Le rôle déterminant de SHP-2 dans le développement proprement dit des leucémies a été démontré chez la souris, où la forme mutante D61G a été exprimée spécifiquement dans les cellules souches de la moelle osseuse (Xu *et al.*, 2010). Ces souris montrent une activation importante des cellules souches hématopoïétiques causant des désordres myeloprolifératifs similaires à ceux qu'on observe dans les leucémies.

Finalement, tel que montré dans le schéma 15, des mutations activatrices de SHP-2 ont, entre autres, été rapportées dans certains cas de tumeurs solides, comme les cancers du poumon et colorectaux (Bentires-Alj *et al.*, 2004). Ces mutations se retrouvent encore une fois sur les domaines N-SH2 ou PTP de SHP-2.

### 5.3.3 SHP-2 et cancer colorectal

Des travaux récents menés dans le laboratoire de la Pre Rivard ont permis de clarifier le rôle de SHP-2 dans le cancer colorectal (Gagné-Sansfaçon *et al.* 2016). Tout d'abord, on a montré que l'expression de SHP-2 est significativement plus élevée dans les tumeurs colorectales en comparaison au tissu sain adjacent. De plus, cette surexpression est surtout retrouvée dans les tumeurs précoces comme les adénomes et les tumeurs de stade 1. De plus, l'inhibition d'expression de SHP-2 réduit fortement les propriétés tumorales (croissance, migration, invasion) des cellules cancéreuses colorectales. Ces résultats suggéraient donc que SHP-2 joue un rôle positif dans la carcinogénèse colorectale. Afin de vérifier si SHP-2 agissait comme un oncogène dans les cellules épithéliales intestinales, un modèle murin qui exprime la forme mutante de SHP-2 retrouvée dans le cancer colorectal (E76K), a été généré. Les résultats montrent que l'expression de cette forme active de SHP-2 spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales induit une hyperprolifération cryptale avec un allongement des cryptes et ce, tant dans l'intestin grêle que dans le côlon (Gagné-Sansfaçon *et al.*, 2016). Avec l'âge, du moins jusqu'à 15 mois, ces souris ne développent cependant pas de tumeurs indiquant que SHP-2 n'est pas un oncogène pour l'épithélium intestinal.

Suite à ce résultat, des croisements avec les souris *Apc*<sup>Min/+</sup> ont été réalisés. Les souris *Apc*<sup>Min/+</sup> sont connues pour former des adénomes quelques semaines après leur naissance et ce, due à l'inactivation du gène suppresseur de tumeur *Apc*. Ceci entraîne une hyperactivation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, une voie qui contrôle la prolifération des cellules souches intestinales. Ces mutations inactivatrices dans le gène *Apc* sont d'ailleurs retrouvées dans plus de 70% des cancers colorectaux humains. De manière intéressante, l'expression de la forme active E76K de SHP-2 chez la souris *Apc*<sup>Min/+</sup> promeut fortement la polypose et ce, tant dans l'intestin grêle que dans le côlon (Gagné-Sansfaçon *et al.*, 2016).

Pris ensemble, ces résultats montrent que l'activation de SHP-2 n'est pas suffisante pour induire la tumorigénèse intestinale mais stimule fortement le développement tumoral en présence de la mutation *Apc* et promeut les propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales.

## 6. Sénescence, cancers et SHP-2

Quelques auteurs ont analysé le rôle SHP-2 dans le contrôle de la sénescence cellulaire lors du développement de certains cancers comme le cancer du sein et le glioblastome.

### 6.1 Cancer du sein

Tout d'abord, le cancer du sein est une maladie hétérogène qui peut être divisée en différents groupes basés sur le statut des récepteurs de l'estrogène (ER) et HER2 (van't Veer *et al.*, 2002 ; Hynes & Lane, 2005 ; Weigelt & Reis-Filho, 2009). Parmi les gènes qui sont altérés dans le cancer du sein, on retrouve le gène *PTPN11* dont l'expression est augmentée dans 70% des cancers du sein invasifs (Zhou *et al.*, 2008). Dans un modèle de souris qui exprime un oncogène moyen T du virus du polyome sous contrôle du promoteur MMTV, un promoteur actif dans les cellules des glandes mammaires, une équipe a montré que les souris développaient un cancer du sein métastatique. Si ces souris sont croisées avec des souris dont le gène encodant *SHP-2* est *floxé*, les auteurs ont observé une réduction significative de la prolifération, particulièrement lorsque les cellules sont cultivées en mammosphères ; en effet, le nombre de cellules formant les mammosphères est fortement réduit dans les cellules déficientes pour l'expression de SHP-2 comparativement aux cellules l'exprimant. Suite à ce résultat, les auteurs ont vérifié si cette inhibition de prolifération était due à une induction de l'apoptose. Un marquage de la caspase-3 active n'a révélé aucune différence dans le nombre de cellules apoptotiques. Les auteurs ont par la suite effectué un marquage de la  $\beta$ -Galactosidase afin de vérifier s'il y avait des signes de sénescence cellulaire. Les mammosphères déficientes pour SHP-2 présentaient une augmentation de plus de 80% du marquage de la  $\beta$ -Galactosidase. De plus, des analyses par immunobuvardage ont révélé une augmentation du niveau de l'histone 3 triméthylée sur la lysine 9 (H3K9me3) (un marqueur dans la structure de la chromatine des cellules sénescents), une augmentation de p27 (un inhibiteur du cycle cellulaire), une augmentation de la phosphorylation de p53 sur la sérine 18 (une phosphorylation induite par les dommages à l'ADN) et une

augmentation de p53. L'inhibition pharmacologique de SHP-2 avec le GS493 chez la souris portant des tumeurs mammaires a confirmé ces résultats. Pris ensemble, cela suggérait que l'inhibition de SHP-2 induit la sénescence cellulaire dans les cellules cancéreuses du sein (Lan *et al.*, 2015).

## 6.2 Glioblastome

Le glioblastome est une tumeur cérébrale assez fréquente qui touche les astrocytes et le système nerveux central. Ces tumeurs surexpriment fréquemment un variant du récepteur de l'EGF (EGFRvIII). Dans cet article, une étude a déjà analysé l'activité de SHP-2 et de ERK1/2 dans le glioblastome primaire et dans l'astrocytome de grade II. Les auteurs ont observé une hausse des activités de SHP-2 et de ERK1/2 dans ces tumeurs comparativement à la marge saine. De plus, l'inhibition d'expression de SHP-2 dans deux lignées cellulaires de glioblastome amène un changement de morphologie important des cellules. En effet, les cellules étaient devenues plus larges et plates que les cellules transfectées avec un siARN contrôle. De plus, les cellules transfectées avec un siARN dirigé contre SHP-2 formaient moins de colonies en agar mou que les cellules parentales et contrôles. Finalement, il a été observé que l'inhibition de SHP-2 provoque finalement une entrée en sénescence des cellules du glioblastome (Sturla, 2011 ; Zhan *et al.*, 2009).

## 7. Hypothèse de recherche

Pris ensemble, ces résultats m'ont permis de formuler l'hypothèse de mon projet de recherche suivante : **la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 promeut la tumorigénèse intestinale en inhibant l'entrée en sénescence cellulaire**. Nous nous sommes fixés comme objectif principal de déterminer si l'inhibition de SHP-2 induit la sénescence cellulaire et de caractériser les mécanismes moléculaires ou sentiers de signalisation impliqués.

Pour les sous-objectifs, le premier est de caractériser l'impact de l'inactivation de SHP-2 sur le phénotype des cellules épithéliales intestinales humaines non-immortalisées (HIEC) ainsi que dans les cellules cancéreuses colorectales (HCT116, Caco2/15). L'impact sur la signalisation ERK/MAPK, le cycle cellulaire (incorporation de BrdU/phase S) et la sénescence (morphologie, marquage  $\beta$ -gal, voies p53 et ARF/p16, dommages à l'ADN) sera particulièrement analysé. Le deuxième sous-objectif est d'analyser les rôles de SHP-2 sur le développement (croissance, protrusions) et le renouvellement (incorporation de EdU/phase S) des organoïdes intestinaux en culture *ex vivo*.

## Matériel et Méthodes

### 1. Matériel

#### 1.1 Anticorps et molécules

Les anticorps ciblant SHP-2 (C-18, sc-280), p14 (FL-132, sc-8340), p21 (C-19, sc-397), la phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 (sc-101696), Mdm2 (N-20, sc-813), p27 (C-19, sc-528) et la forme totale de ERK (ERK2) (C-14, sc-154) ont été achetés chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, É-U). L'anticorps contre l'actine (MAB1501R) a été acheté chez Millipore (Billerica, MA, É-U). L'anticorps contre les ERK1/2 phosphorylées (M8159) provient de Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É-U). L'anticorps reconnaissant la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 (16G8) provient de Cell signaling (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, E-U). L'anticorps contre p53 (131442) a été acheté chez Abcam (Abcam, Toronto, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-lapin « horseradish peroxidase » (HRP) (NA931V) et anti-souris HRP (NA934V) ont été achetés de GE Healthcare Life Sciences (Mississauga, ON, Canada). Les anticorps secondaires anti-lapin phosphatase alcaline (PA) et anti-souris PA proviennent de Promega (Madison, WI, É-U). Tous les anticorps ont été utilisés selon les recommandations des fabricants.

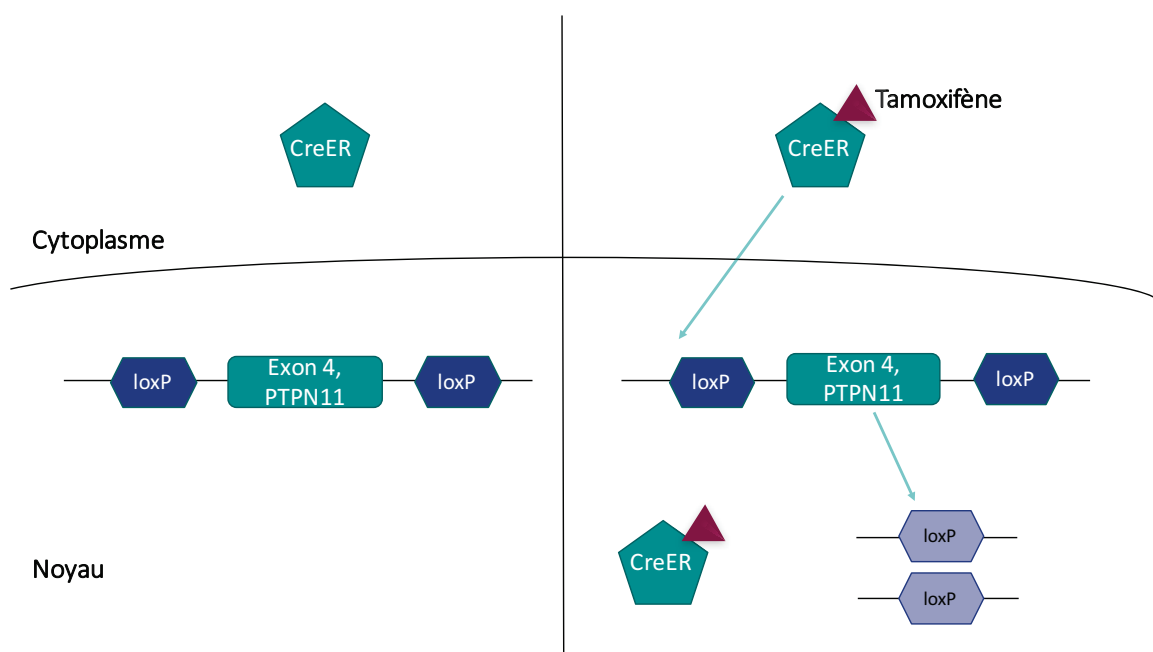
Le BrdU a été acheté chez Life technologies (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Le X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-Galactopyranoside) provient de chez Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Le 4-hydroxy-tamoxifène (17308) provient de chez Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, É-U). La blasticidine (1945B62) a été acheté chez Invitrogen (San Diego, CA, É-U) et l'insuline provenant de chez Lilly a été acheté au magasin du CHUS de l'Université de Sherbrooke. L'inhibiteur pharmacologique de SHP-2, le PTP IIB08, a été acheté chez Calbiochem (565852, Etobicoke, ON, Canada)

### 2. Méthodes

#### 2.1 Souris

Pour obtenir les souris avec une délétion conditionnelle inductible de *Shp-2* dans l'épithélium intestinal, les souris *Shp-2<sup>flox-flox</sup>* (obtenues du Dr Gen-Sheng Feng, USCD, San Diego, É-U) ont été croisées avec des souris *VillineCre<sup>ERT2</sup>* (el Marjou *et al.* 2004). De ce croisement, nous obtenons les souris *Shp-2<sup>flox-wt</sup>; VillineCre<sup>ERT2</sup>*. Nous croisons, par la suite, ces souris avec des souris *Shp-2<sup>flox-flox</sup>*, pour obtenir des souris *Shp-2<sup>ffl</sup>; VillineCre<sup>ERT2</sup>*. Dans ces souris, l'expression de l'enzyme Cre

recombinase est donc sous le contrôle du promoteur du gène de la *villine*. La villine est une protéine qui est exprimée dans les cellules de l'épithélium intestinal (Wang et al., 2016). Dans notre cas, la Cre recombinase est inductible au tamoxifène, un anti-œstrogène. La Cre recombinase inductible est liée au récepteur aux œstrogènes et cela la séquestre dans le cytoplasme sous forme inactive. Une fois que le tamoxifène lie le récepteur, la Cre recombinase transloque au noyau sous sa forme active et peut alors catalyser une recombinaison homologue entre deux séquences loxp (Schéma 1).



**Schéma 1 : Activation de la Cre recombinase inductible par injection de tamoxifène**

**A.** La séquence d'un récepteur aux œstrogènes (RE) est d'abord ajoutée à la séquence codante de la Cre recombinase. Suite à cet ajout, la Cre recombinase synthétisée sera séquestrée dans le cytoplasme. **B.** Le tamoxifène se lie au récepteur de l'oestrogène, ce qui va entraîner la translocation de la Cre au noyau. Une fois au noyau, celle-ci est en mesure de procéder à la délétion de la séquence se trouvant entre les séquences loxp.

Pour le génotypage des souris, des bouts d'orteils ont d'abord été prélevés chez des souriceaux âgés de quatre à sept jours. L'ADN génomique a été extrait par digestion dans 100 µl de NaOH 2,5 mM, EDTA 0,2 mM pendant une heure à 95°C. Par la suite, la solution a été neutralisée dans 100 µl de Tris-HCl 40 mM, pH 5,5 (Truett *et al.*, 2000). Les réactions de PCR décrites précédemment (Zhang *et al.*, 2004 ; Madison *et al.*, 2002) ont par la suite été effectuées. Le produit de PCR est par la suite migré sur un gel 1 % d'agarose à 110 V pendant environ 20 minutes (Fisher Biotech FB105). Les bandes sont révélées grâce à du RedSafe Nucleic Acid Staining Solution 0,005 % v/v mis dans le gel d'agarose (21141, FroggaBio, Toronto, ON, Canada) puis sous la lampe UV (MBI Lab Equipment, Dorval, QC, Canada).

À 12 semaines, les souris sont injectées de façon intrapéritonéale avec de la kétamine/xylazine (87 mg de kétamine/13 mg de xylazine par kg), puis sont euthanasiées par dislocation cervicale. Le jéjunum et le côlon sont récoltés pour procéder à la mise en culture des organoïdes (voir section 2.2).

## 2.2 Mise en culture d'organoïdes

### *2.2.1 Mise en culture du jéjunum (Entéroïdes)*

D'abord une fois le jéjunum récolté, il faut ouvrir longitudinalement le jéjunum et bien le rincer dans du PBS froid. Le jéjunum est coupé en petit morceaux d'environ 5 mm, puis lavés dans du PBS froid suivi d'un lavage de 5 minutes dans le PBS-EDTA 30 mM. Les tissus sont incubés dans une nouvelle solution de PBS-EDTA 30 mM pour 20 minutes. Le surnageant est jeté et les tissus sont resuspendus dans du PBS froid. Par brassage, les cryptes sont isolées dans un tube de type Falcon 50 mL jusqu'à temps d'obtenir une bonne quantité de cryptes sans créer trop de déchets suite au brassage. Le surnageant est cette fois-ci récolté, passé sur un filtre 70 µm (352350, Corning, Bedford, MA, É-U) et centrifugé à 150 g à 4°C (Eppendorf 5810, Eppendorf, Hauppauge, NY, É-U) pendant 5 minutes. Ensuite, le culot est resuspendu dans du milieu Advanced DMEM/F12 +++ (12634-010, Life Technologies, Carlsbad, CA, É-U) (500 mL) avec 5 mL de glutamax (35050-061, Life Technologies), 5 mL d'HEPES 1 M (330-050-EL, Wisent, St-Bruno, QC, Canada) et 2,5 mL de pénicilline/streptomycine (450-201-EL, Wisent). Il y a ensuite une centrifugation à 150 g à 4°C pendant 5 minutes. Par la suite, le culot est resuspendu dans du Matrigel jusqu'à l'obtention d'un



volume de cryptes désiré. Il y a ensemencement des cryptes dans une plaque 48 puits (20  $\mu$ L par puits). La plaque est déposée dans un incubateur à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub> pendant au moins 20 minutes pour laisser le Matrigel figer. Ensuite, 250  $\mu$ L de milieu ENR est ajouté dans tous les puits. Le milieu ENR est composé de : du milieu Advanced DMEM/F12+++, de 1,25 mM N-acétylcystéine (A9165, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) de l'EGF 50 ng/mL (Life Technologies PMG8045), du milieu conditionné Noggin à 10 %, du milieu conditionné R-Spondine à 10 %, du supplément B27 2 % v/v (Life technologies 17504-044) et du supplément N2 1 % v/v (Life technologies 17502-048). Les milieux conditionnés de R-Spondine et de Noggin ont été obtenus suite à la culture de cellules 293T surexprimant la protéine d'intérêt et cultivées dans du milieu DMEM 10 % FBS inactivé, glutamax 1 % v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1 % v/v (330-050-EL, Wisent) et pénicilline/streptomycine 0.5 % v/v (450-201-EL, Wisent). Les cellules surexprimant et sécrétant Noggin proviennent du Dr. G. R. van den Brink (Hubrecht Institute, Utrecht, Pays-Bas) et celles surexprimant et sécrétant la R-Spondine proviennent du Dr. C. Kuo (Stanford University, Stanford, CA, É-U). Une sélection à la puromycine (1  $\mu$ g/mL) est utilisée pour les cellules exprimant le Noggin et une sélection à la zéomycine (3  $\mu$ g/mL) est utilisée pour les cellules exprimant la R-Spondine. Les cellules sont passées avec de la trypsine 0,05 % dans des flasques T175 dans du milieu Advanced DMEM/F12+++ et cultivées dans ce milieu à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub> pendant 7 jours. Le milieu est récolté, centrifugé à 1000 RPM pendant 5 minutes puis filtré sur filtre 0,22  $\mu$ m.

### *2.2.2 Mise en culture de côlon (Colonoïdes)*

D'abord, le côlon d'une souris est prélevé et ouvert longitudinalement sans enlever les fèces. Ensuite, le colon est rincé dans du PBS froid. Le côlon est coupé environ en trois morceaux qui sont lavés dans du PBS froid. Les lavages sont répétés jusqu'à l'obtention d'un liquide clair. Les tissus sont incubés dans une solution de PBS-EDTA 5 mM pour une heure avec petite agitation constante. Le PBS-EDTA 5 mM est enlevé et remplacé par du PBS. Les cryptes sont décollées par grattage au fond d'un Pétri. À l'aide d'une micropipette p1000, les cryptes sont brisées suite au grattage. Les cryptes sont par la suite filtrées sur un filtre 70  $\mu$ m (352350, Corning, Bedford, MA, É-U) et centrifugées à 360 g à 4°C (Eppendorf 5810) pendant 3 minutes. Le culot est lavé au PBS et recentrifugé 2 fois. Par la suite, le culot est resuspendu dans du Matrigel jusqu'à temps d'obtenir un volume de cryptes désiré. Il y a ensemencement des cryptes dans une plaque 48 puits (15  $\mu$ L par puits). La plaque est déposée dans un incubateur à 37°C avec 5 % CO<sub>2</sub> pendant

au moins 20 minutes pour laisser le Matrigel figer. Ensuite, 250 µL de milieu WENR est ajouté dans tous les puits. La composition du milieu WENR va comme suit : le milieu WNR est dilué au demi dans du milieu Advanced DMEM/F12+++, puis il y a l'ajout de 1,25 mM N-acétylcystéine (Sigma A9165), de l'EGF 50 ng/mL (Life Technologies PMG8045), du supplément B27 2 % v/v (Life technologies 17504-044) et du supplément N2 1 % v/v (Life technologies 17502-048). Le milieu conditionné WNR est obtenu à partir de la culture des cellules L-WRN (ATCC® CRL-3276™). Ces cellules sont tout d'abord cultivées dans du milieu DMEM (319-005-CL, Wisent) contenant 10 % FBS, glutamax 1 % v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1 % v/v (330-050-EL, Wisent) et pénicilline/streptomycine 0,5 % v/v (450-201- EL, Wisent) en présence de G418 (500 µg/ml) et d'hygromycine (500 µg/ml) à 37°C et 5 % CO<sub>2</sub> pendant 3-4 jours afin de maintenir une pression de sélection. Après expansion, les cellules sontensemencées dans des flasques T175. Une fois les cellules à confluence, le milieu de culture est changé, remplacé par du milieu DMEM advanced contenant 20 % FBS, glutamax 1 % v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1 % v/v (330-050-EL, Wisent) et pénicilline/streptomycine 0,5 % v/v (450-201- EL, Wisent) puis récolté 24h plus tard (fraction 1). Après centrifugation à 2000 g pendant 5 minutes, le surnageant de culture est transféré dans une bouteille de 1 litre que l'on conserve à 4 °C en attendant la récolte des autres fractions qui se fait toutes les 24h (4 fractions au total). Une fois les 4 fractions récoltées, le milieu est filtré sur filtre 0,22 µm, puis aliquoté et conservé à -80 degrés (Miyoshi H *et al.*, 2013).

### 2.3 Culture d'organoïdes et passages

Les milieux des entéroïdes et des colonoïdes sont changés tous les 3 jours. Les entéroïdes sont passés environ à tous les 5-6 jours. Le milieu est aspiré dans les puits. Le Matrigel de quatre puits est resuspendu dans 500 µL de milieu Advanced DMEM/F12+++ froid mis dans un tube de type Falcon 15 mL. En utilisant une pipette dont l'extrémité a été rapetissée à la flamme, le mélange milieu et entéroïdes est aspiré et refoulé environ 10-15 fois. Les entéroïdes sont centrifugés à 150 g à 4°C pendant 5 minutes. Ils sont ensuite mis en culture tel que décrit dans la section 2.2.1.

Les colonoïdes sont passés environ à tous les 5 jours. Le milieu est aspiré dans les puits. Le Matrigel de quatre puits est resuspendu dans 500 µL de milieu Advanced DMEM/F12+++ froid mis dans un tube de type Falcon 15 mL. En utilisant une pipette dont l'extrémité a été rapetissée à la flamme, le mélange milieu et entéroïdes est aspiré et refoulé environ 10 fois. Les colonoïdes sont

centrifugés à 360 g à 4°C pendant 3 minutes. Ils sont ensuite mis en culture tel que décrit dans la section 2.2.2.

#### 2.4 Incorporation de l'EdU

Les organoïdes doivent d'abord être mis en culture dans une Lab-tek (177445, ThermoFisher Scientific). Les organoïdes sont incubés pendant une heure avec une solution d'EdU 1 mM à 37°C. Après l'incubation, les organoïdes sont fixés à l'aide de paraformaldéhyde 4 % (P6148, Sigma-Aldrich) dans du PBS pour 30 minutes à la température de la pièce. Les organoïdes sont ensuite lavés dans du PBS-BSA 3 %. Les organoïdes peuvent être gardés dans le PBS à 4°C pendant plusieurs jours. Par la suite, les organoïdes sont perméabilisés dans du Triton X-100 5%/PBS pendant 20 minutes à la température pièce. Il y a un lavage au PBS-BSA 3 %, puis les organoïdes sont bloqués au PBS-BSA 2 % pour 30 minutes à la température de la pièce. Suite à l'incubation, il y a un rinçage dans du PBS-BSA 3 %. La réaction de détection de l'EdU est déclenchée avec 200 µL de réaction par puits de Lab-tek. La solution de réaction contient : 172 µL de Click-iT® reaction buffer 1X (Tampon Tris), 8 µL de CuSO<sub>4</sub> 100 mM, 0,48 µL d'Alexa Fluor® azide 555, 20 µL de Reaction buffer additive (C10228, Click-iT® EdU Imaging Kit, Invitrogen) pendant 30 minutes à la température de la pièce et à l'abri de la lumière. Ensuite, un rinçage au PBS-BSA 3 % est effectué et les noyaux sont colorés avec une solution de Hoechst 33342 (C10228, Click-iT® EdU Imaging Kit, Invitrogen) à une concentration finale de 5 µg/mL pendant 30 minutes à l'abri de la lumière à la température de la pièce. Les organoïdes sont ensuite rincés au PBS, puis la Lab-tek est montée avec du milieu de montage l'Immunmount. Les photos sont prises au microscope inversé Olympus confocal FV1000 (Olympus Corporation, Tokyo, Japon) de la plateforme de microscopie photonique de la FMSS de l'Université de Sherbrooke.

#### 2.5 Induction de la délétion de Shp-2 à l'aide du tamoxifène

Le 4-hydroxy-tamoxifène (1 mg) a été resuspendu dans 1,04 mL d'éthanol 100 % pour obtenir une concentration de 10 000 X, puis chauffé brièvement à 75°C, pour faciliter la dissolution. Nous utilisons une dilution de 1000 X pour faire nos expériences. Après 48 heures de mise en culture, les organoïdes sont prêts à avoir l'ajout soit d'éthanol comme contrôle ou bien du 4-hydroxy-tamoxifène dans leur milieu à une concentration de 1000 X. Suite à l'ajout d'éthanol ou bien du 4-hydroxy-tamoxifène, les organoïdes sont pris en photos aux temps désirés.

## 2.6 Culture cellulaire

La lignée cellulaire HCT116 a été obtenue d'ATCC (CCL-247, CEDARLANE Corporation, Burlington, ON, Canada) et a été préalablement isolée d'un carcinome humain. Cette lignée cellulaire est cultivée dans du milieu McCoy's 5A (317-010-CL, Wisent) contenant 10 % FBS, glutamax 1 % v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1 % v/v (330-050-EL, Wisent) et pénicilline/streptomycine 0,5 % v/v (450-201- EL, Wisent).

La lignée cellulaire Caco-2/15 (gracieuseté du Pr Jean-François Beaulieu, FMSS, Université de Sherbrooke) provient d'un clone isolé de la lignée cellulaire Caco-2 qui elle provient d'un adénocarcinome humain (HTB 37, ATCC). Cette lignée cellulaire est cultivée dans du milieu DMEM (319-005-CL, Wisent) contenant 10 % FBS, glutamax 1 % v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1% v/v (330-050-EL, Wisent) et pénicilline/streptomycine 0,5 % v/v (450-201- EL, Wisent).

Finalement, les cellules HIEC («Human intestinal epithelial cells ») ont été isolées de cryptes d'intestin fœtal humain puis établies en culture par Perreault et Beaulieu (1996). Ces cellules sont non immortalisées et prolifèrent jusqu'à l'atteinte de la confluence. Elles sont cultivées dans du milieu d'Opti-MEM (31985-070, Thermo Fisher Scientific) contenant 5% FBS, glutamax 1 % v/v (35050-061, Life Technologies), Hepes 1 % v/v (330-050-EL, Wisent), pénicilline/streptomycine 0,5 % v/v (450-201- EL, Wisent) et insuline 100 unités/mL.

Ces cellules sont incubées dans un incubateur à 37°C et à 5 % CO<sub>2</sub>. Le milieu des cellules est changé tous les deux jours et les cellules sont passées avant la confluence avec l'aide de la trypsine 0,05 % avec une dilution de 1/10 pour les HCT116, 1/5 pour les Caco-2/15, et 1/2 à 1/3 pour les HIEC.

### *2.6.1 Production des lentivirus*

La veille de la transfection, les cellules 293T, sont passées dans un rapport 1/10. Les cellules 293T sont cultivées dans un milieu DMEM 10 % FBS avec 1 % glutamax, 1 % Hepes et 0,5 % pénicilline/streptomycine. Pour la transfection, la lipofectamine (48 µL, 11668-019, Invitrogen)

est incubée durant 5 minutes dans 750  $\mu$ L d'Opti-MEM (31985-070, Thermo Fisher Scientific). Durant l'incubation, on fait le mélange de 6  $\mu$ g de chaque plasmide soit des plasmides exprimant les protéines d'encapsidation PLPVGS, PLP1, PLP2, puis des plasmides contenant les shARN contrôles et finalement les plasmides contenant les shARN spécifiques de SHP-2 et ce, dans 750  $\mu$ L d'Opti-MEM pour chaque plasmide. Le vecteur d'expression plenti6-U6 est construit tel que décrit précédemment (Garneau *et al.*, 2009). Les oligonucléotides ciblant la protéine SHP-2 de forme humaine (5' gggccagagcagtcagtaa 3') a été déterminé par bio-informatique en utilisant le programme Block-iT RNAi Designer de Invitrogen. La séquence 5' ttcaagaga 3' a servi de boucle. Les oligonucléotides ont été hybridés avant d'être sous-clonés entre les sites de restriction BamHI et XhoI. Un shARN contenant une séquence mélangée du shSHP-2 humain ont servi de témoin négatif (shcontrôle). Les deux solutions de 750  $\mu$ L sont combinées puis incubées pour 20 minutes à la température de la pièce. Le mélange est par la suite ajouté aux cellules dont le milieu a été retiré pour une période de 4 heures à 37°C à la suite duquel l'Opti-MEM est enlevé et remplacé par 6 mL de milieu de culture des cellules. La récolte de virus a lieu 2 jours après la transfection. Le milieu est récolté et passé dans un filtre 0,45  $\mu$ m (4184, Pall, Port Washington, NY, É-U) et entreposé à -80°C.

### 2.6.2 Infection des cellules

Les cellules sont passées avant leur infection. Le jour de l'infection, l'ajout de 1 mL de milieu contenant le virus est déposé dans le Pétri de 100 mm avec du polybrène 8  $\mu$ g/mL (Bromide d'hexadiméthrine, H9268-5G, Sigma-Aldrich). Les cellules sont incubées 1 heure à 37°C avec ce 1 mL de virus. Suite à l'incubation, on ajoute 9 mL du milieu de culture pour chaque lignée cellulaire avec 18  $\mu$ L de polybrène. Les cellules sont incubées pour deux jours à 37°C. Ensuite, les cellules seront mises en présence de l'antibiotique dont le gène de résistance est exprimé par leur plasmide, soit 5  $\mu$ g/mL blasticidine (46-1120, Life Technologies) ajouté dans le milieu fraîchement changé. Pour s'assurer que la sélection fonctionne bien, des cellules non infectées sont aussi mises en présence de l'antibiotique. La validation de la baisse d'expression de SHP-2 est ensuite effectuée par immunobuvardage (Section 2.8).

## 2.7 Lyse cellulaire

Les cellules qui ont atteint la confluence désirée pour être lysées sont mise sur glace pour ne pas modifier leur statut de phosphorylation des protéines. Les cellules sont rincées deux fois au PBS et sont par la suite lysées dans du tampon Laemmli 1X. Les lysats récoltés sont chauffés à 95°C pendant 5 minutes et soniqués à 25 % d'amplitude pendant 5 secondes (Sonic Dismembrator Ultrasonic Processor, Fisher Scientific). Avant d'être déposé sur gel SDS-PAGE, du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du bleu de bromophénol à une concentration finale 1 % v/v sont ajoutés aux lysats Laemmli.

## 2.8 Immunobuvardage

Suite à la lyse des cellules, les protéines sont dosées à l'acide bicinchonique et  $\text{CuSO}_4$  selon la méthode décrite par Smith *et al.*, (1985). Les protéines sont resuspendues dans du Laemmli contenant du bleu de bromophénol 1 % et du  $\beta$ -mercaptoéthanol 1 %. Les protéines sont migrées sur un gel SDS-Page au pourcentage désiré pour environ 1h10 à 150V. Les gels SDS-PAGE disons pour un gel de 12,5 % contiennent 6,25 mL de solution monomère, 3,75 mL d'une solution de running à pH 8,8, 150  $\mu\text{L}$  de solution SDS 10 %, 4,8 mL d'eau distillé, 150  $\mu\text{L}$  d'APS, puis 10  $\mu\text{L}$  de TEMED. Une fois le « running » figé, nous effectuons le « stacking » qui lui est composé de : 0,665 mL de solution monomère, 1,25 mL d'une solution de « stacking » à pH 6,8, 50  $\mu\text{L}$  de solution SDS 10 %, 3 mL d'eau distillé, 50  $\mu\text{L}$  d'APS, puis 5  $\mu\text{L}$  de TEMED. Le gel SDS-Page est par la suite transféré sur une membrane de type PVDF à 400 mA pour 4 heures. Suite au transfert des protéines sur la membrane, celle-ci est coloré au rouge de Ponceau (0,2-0,8 g/100 mL de TCA 3 %) (P3504, Sigma- Aldrich). Cette méthode permet de révéler les bandes correspondant aux protéines. La membrane est séchée pour identifier le marqueur de poids moléculaire, ensuite il y a réhydratation dans du méthanol puis blocage avec du lait en poudre 5 % PBS/Tween 0,05 %. Suite au blocage, les anticorps primaires sont incubés avec la membrane dans du lait en poudre 5 % PBS/Tween 0,05 % à 4°C sur la nuit ou bien pendant deux heures à température de la pièce. Après l'incubation, les membranes sont lavées trois fois dans du PBS Tween 0,05 % pour environ 10 minutes à chaque lavage. Par la suite, il y a incubation de l'anticorps secondaire dans du lait en poudre 5% PBS/Tween 0,05 % pour une heure à la température de la pièce. L'anticorps secondaire peut être couplé de deux manières distinctes. Premièrement, l'anticorps secondaire est couplé au HRP pour une révélation par chimiluminescence avec une solution d'ECL maison (90 mM

d'acide coumarique (C9008, Sigma-Aldrich), 250 mM de luminol (A8511, Sigma-Aldrich), 0,03 % peroxyde d'hydrogène (7722-84-1, Sigma-Aldrich), tampon Tris pH 8,5). L'anticorps secondaire peut être aussi couplé à la phosphatase alcaline pour une révélation avec une solution Tropic® CDP-Star® (T2305, ThermoFisher Scientific) 1/200 dans du tampon 100 mM Tris, 100 mM HCl pH 9,5. Pour les deux anticorps secondaires, il y a révélation par autoradiographie (Denville Scientific Inc., Saint-Laurent, QC, Canada).

## 2.9 Extraction d'ARN de cellules et d'organoïdes

Les cellules ou organoïdes qui ont atteint la confluence désirée pour être lysés sont mis sur glace pour éviter la dégradation de l'ARN. Les cellules ou organoïdes sont rincés deux fois au PBS et sont par la suite lysés dans un mélange contenant 600 µL tampon RLT avec 0,6 µL de  $\beta$ -mercaptoéthanol. Pour les cellules, elles sont décollées à l'aide d'un grattoir cellulaire. Pour les organoïdes, il faut prendre en moyenne 8 puits dans 600 µL total pour obtenir assez d'ARN. Ces prélèvements sont congelés rapidement à -80°C jusqu'à l'extraction. Pour l'extraction cellulaire et d'organoïdes, les échantillons sont décongelés suivi d'une lyse mécanique par l'utilisation d'une aiguille de 20G. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13000 rpm à 4°C durant 5 minutes pour éliminer les débris suite à la lyse mécanique. L'extraction d'ARN se déroule avec le « Kit » RNeasy de la compagnie Qiagen (74106) selon les instructions du fabricant. Finalement, il y a resuspension des échantillons extraits dans de l'eau sans RNase. Les échantillons sont par la suite dosés à l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Par la suite, il faut procéder au protocole de la transcriptase inverse. Ce protocole nous permet d'obtenir un ADN complémentaire qui est possible d'analyser en PCR quantitative en temps réel. Le protocole de la transcriptase inverse provient de la compagnie Roche (Transcriptor Reverse Transcriptase, 03531317001, Roche, QC, Canada), en utilisant une concentration d'ARN de 1000 ng. Afin d'éliminer les contaminations aux RNases, du « Protector RNase inhibitor » (3335399001, Roche) a été ajouté au mélange de réaction des transcriptions inverses. Les analyses en PCR quantitative ont été par la suite effectuées par la plateforme de RNomique de l'Université de Sherbrooke. Pour les cellules, l'expression des gènes a été normalisée sur les gènes de références : MRPL19, FLT3LG; RPL13A. Pour les organoïdes l'expression des gènes analysés a été normalisée sur l'expression de trois gènes de références soit : *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*.

## 2.10 Immunofluorescence

### *2.10.1 Immunofluorescence des cellules ensemencées sur lamelle*

Les cellules sont ensemencées sur lamelle jusqu'à l'atteinte de la confluence désirée dans l'environnement de culture cellulaire et dans un incubateur à 37°C et à 5 % CO<sub>2</sub>. Les cellules sur lamelle sont rincées rapidement au PBS et elles sont fixées à l'aide de la paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à température de la pièce. Les cellules sont ensuite lavées, puis perméabilisées avec du Triton X-100 5 %/PBS pendant 10 minutes. Trois lavages au PBS sont effectués. Par la suite, une solution de blocage PBS-BSA 2 % est ajoutée durant 15 minutes à la température de la pièce. Enfin, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire dans du PBS-BSA 2 % pour la nuit à 4°C. Le lendemain, on procède à trois lavages au PBS puis les cellules sont incubées pendant une heure avec l'anticorps secondaire dans du PBS-BSA 2 % à la température de la pièce et à l'abri de la lumière. Ensuite, un lavage au PBS est effectué suivi d'une coloration des noyaux avec le DAPI (Sigma-Aldrich). Les lames sont montées à l'aide du milieu de montage l'ImmuMount. Les photos sont prises au microscope inversé Zeiss de la plateforme de microscopie photonique de la FMSS de l'Université de Sherbrooke.

### *2.10.2 Immunofluorescence BrdU sur cellules*

Les cellules sont ensemencées sur lamelle jusqu'à l'atteinte de la confluence désirée dans l'environnement de culture cellulaire soit dans un incubateur à 37°C et à 5 % CO<sub>2</sub>. Une fois la confluence désirée atteinte, le BrdU (BrdU labeling Reagent, Life technologies) est ajouté pour une période de deux-trois heures pour les HCT116 et les Caco-2/15 et pour une période de six heures pour les HIEC. Ensuite, les lamelles sont lavées trois fois au PBS. Les cellules sont fixées dans une solution de fixation (7 volumes EtOH 100 % avec 3 volumes de glycine 50 mM pH 2,0) pendant 45 minutes à la température ambiante. Les cellules sont lavées deux fois dans du PBS, avant d'être dénaturées avec du HCL 4N pendant 15 minutes à la température de la pièce. Les cellules sont par la suite bloquées avec du PBS-BSA 0,5 %/Tween 0,1 % pendant 10 minutes à la température ambiante. Les cellules sur les lamelles sont incubées 45 minutes à 37°C avec le BrdU 1/50 dans une chambre humide. Il y a trois lavages au PBS et les lamelles sont finalement montées sur des lames avec le milieu de montage Immu-Mount.



## 2.11 Inhibiteur pharmacologique

### *2.11.1 Inhibiteur pharmacologique de Shp-2 PTP IIB08*

L'inhibiteur a été resuspendu dans du DMSO pour obtenir une concentration stock à 100 mM. Des dilutions en séries ont été faites pour obtenir des concentrations de 50 mM et 25 mM. La condition contrôle correspond à l'ajout de DMSO seulement.

Des organoïdes ont étéensemencés et cultivés dans des plaques 48 puits. L'ajout de l'inhibiteur à une concentration de 30  $\mu$ M s'est effectué après 48 heures en culture cellulaire suivi d'une prise de photos représentatives en microscopie de contraste de phase aux temps 0, 24 et 48 heures.

### *2.11.2 Inhibiteur pharmacologique de Shp-2 soit le SHP099*

L'inhibiteur a été resuspendu dans du DMSO pour obtenir une concentration stock à 100 mM. Nous avons utilisé l'inhibiteur à une concentration de 10  $\mu$ M.

Des organoïdes ont étéensemencés et cultivés dans des plaques 48 puits. L'ajout de l'inhibiteur à une concentration de 10  $\mu$ M s'est effectué après 48 heures en culture cellulaire suivi d'une prise de photos représentatives en microscopie de contraste de phase aux temps 48 heures et 72 heures.

## 2.12 Essai de coloration pour la détection de l'activité $\beta$ -Galactosidase

Les cellules sontensemencées dans des Pétris jusqu'à l'atteinte de la confluence désirée dans l'environnement de culture cellulaire soit dans un incubateur à 37°C et à 5 % CO<sub>2</sub>. Une fois la confluence désirée atteinte, les cellules sont lavées deux fois au PBS. Ensuite, les cellules sont fixées avec une solution de fixation fraîche pour 3 à 5 minutes à la température de la pièce. La solution de fixation est composée de 3,7 % formaldéhyde 37 % dans du PBS. Après la fixation, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS, puis les cellules sont incubées avec la solution de coloration pour un temps variant de 8 à 16 heures à l'abri de la lumière dans un incubateur à 37°C. La solution de coloration que l'on doit cacher de la lumière se compose de 1 mg/mL de X-Gal (le X-gal est dissous à 20 mg/mL dans le diméthylformamide), 40 mM tampon acide citrique/sodium

phosphate pH 6,0, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 150 mM NaCl et 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Il est important de bien respecter le pH à 6,0, puisqu'à un pH de 4,0 toutes les cellules marquent de manière non spécifique.

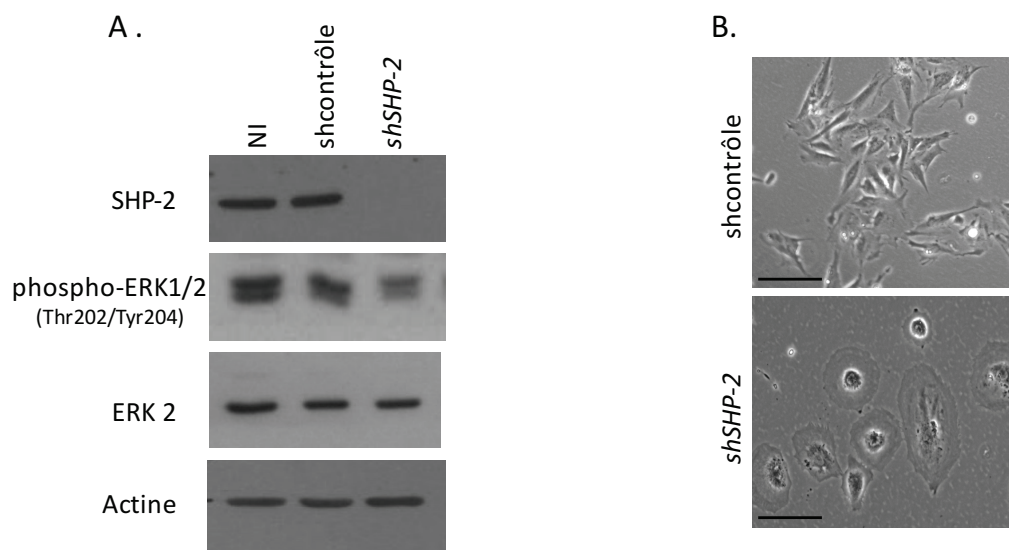
### 2.13 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ainsi que les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, CA, É-U). La significativité a été déterminée par un « Student t test » paramétrique lorsque les données suivaient une loi normale. Pour les décomptes du nombre de ramifications des organoïdes, un test de chi square a été utilisé. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque l'erreur était :  $p \leq 0,05$  (\*),  $p \leq 0,01$  (\*\*),  $p \leq 0,001$  (\*\*\*) et  $p \leq 0,0001$  (\*\*\*\*). La barre d'erreur représente l'erreur type de la moyenne.

## Résultats

### 1. L'inhibition d'expression de la phosphatase SHP-2 induit la sénescence dans les cellules épithéliales intestinales normales humaines

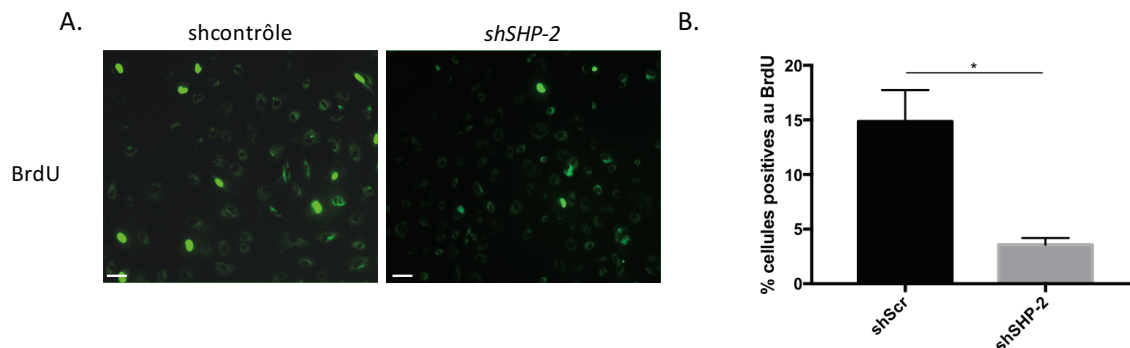
Afin d'étudier le rôle de la phosphatase SHP-2 au sein de l'épithélium intestinal, j'ai d'abord employé des HIEC, des cellules épithéliales intestinales humaines non-immortalisées isolées par le laboratoire du professeur Beaulieu (Perreault & Beaulieu 1996) que j'ai infectées avec des lentivirus exprimant soit un shARN dirigé contre *PTPN11* (HIEC<sup>ΔSHP-2</sup>) ou un shARN contrôle. Tout d'abord, j'ai validé mon modèle par immunobuvardage (Figure 1A) et j'obtiens bien une diminution de l'expression protéique de SHP-2 dans les cellules HIEC<sup>ΔSHP-2</sup> en comparaison aux HIEC contrôles. De plus, la sous-expression de SHP-2 induit une réduction de l'activité des kinases ERK1/2 telle qu'attendu puisque SHP-2 est impliquée dans l'activation de la voie Ras/MAPK) (Cargnello 2011) (Figure 1A). De manière intéressante, les cellules exprimant un shARN contre *PTPN11* ont une forme beaucoup plus élargie et aplatie comparativement aux cellules exprimant un shARN contrôle (Figure 1B). Suite à ces résultats, nous avons fait une incorporation de BrdU dans les HIEC et nous avons vu qu'il y avait une diminution du nombre de cellules en phase S dans les HIEC<sup>ΔSHP-2</sup> comparativement aux cellules contrôles (Figure 2A-C).



**Figure 1 : La baisse d'expression de SHP-2 affecte la morphologie des HIEC.**

**A.** Immunobuvardage contre SHP-2, ERK1/2 et la forme phosphorylée de ERK1/2 (T202/Y204) dans des lysats de cellules HIEC non infectées (NI) ou exprimant de manière stable un shARN dirigé

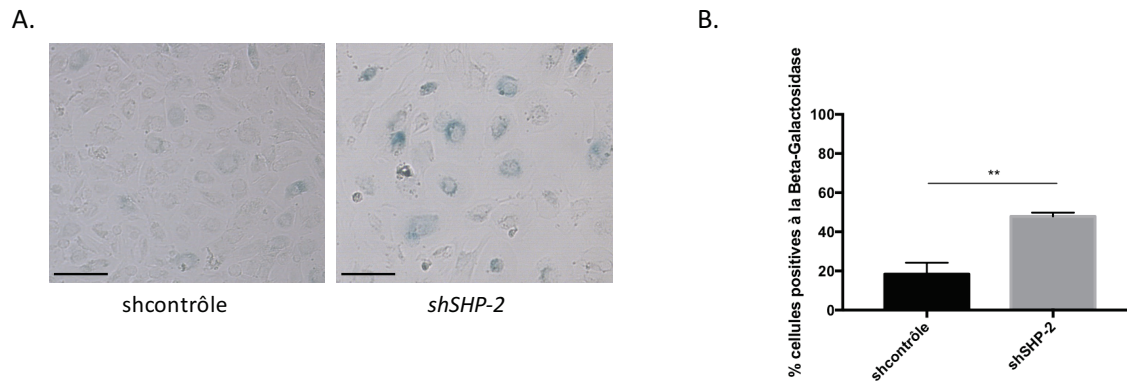
contre SHP-2 (shSHP-2) ou un shARN contrôle (shcontrôle). L'immunobuvardage contre l'actine et ERK2 a été effectué en guise de contrôle de dépôt. **B.** Photos représentatives prises en microscopie en contraste de phase des HIEC exprimant un shSHP-2 et des HIEC exprimant un shcontrôle après 10 jours en culture cellulaire. Barre de calibration 100  $\mu$ m. N=5.



**Figure 2 : La baisse d'expression de SHP-2 diminue la prolifération des cellules HIEC.**

**A.** Les HIEC exprimant un shARN contrôle ou un shARN dirigé contre SHP-2 ont été incubées durant 6 heures avec du BrdU, puis fixées pour une analyse par immunofluorescence. N=3, Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** Le nombre des cellules BrdU positives (vert) a été calculé par rapport au nombre total de cellules. Le pourcentage est montré sur le graphique. N=3 \* $p$ <0,05. Le graphique représente la moyenne  $\pm$  SEM.

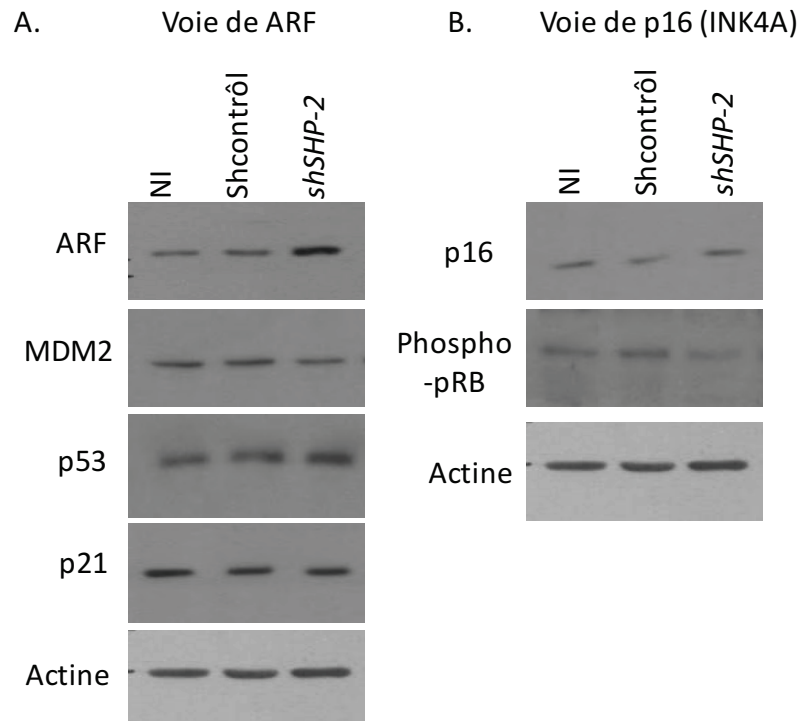
Une baisse de la prolifération et un changement morphologique peuvent être associés à de la sénescence cellulaire (Campisi et *al.*, 2007). Pour valider cette hypothèse, nous avons fait un marquage de la  $\beta$ -Galactosidase qui colore les cellules sénescents en bleues. Comme le démontre la Figure 3A, il y a une augmentation d'environ 50% du nombre de cellules bleues dans les HIEC exprimant un shARN contre SHP-2 en comparaison aux cellules contrôles, ce qui a été quantifié dans le graphique de la Figure 3B.



**Figure 3 : La baisse d'expression de SHP-2 induit la sénescence chez les cellules HIEC.**

**A.** Photos représentatives en microscopie en contraste de phase des cellules exprimant un shARN dirigé contre SHP-2 ou un shARN contrôle après 10 jours en culture cellulaire et fixées. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** Le nombre des cellules positives à la  $\beta$ -galactosidase (bleues) a été calculé par rapport au nombre total de cellules. Le pourcentage est montré sur le graphique. N=4 \*\*p<0,001. Le graphique représente la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

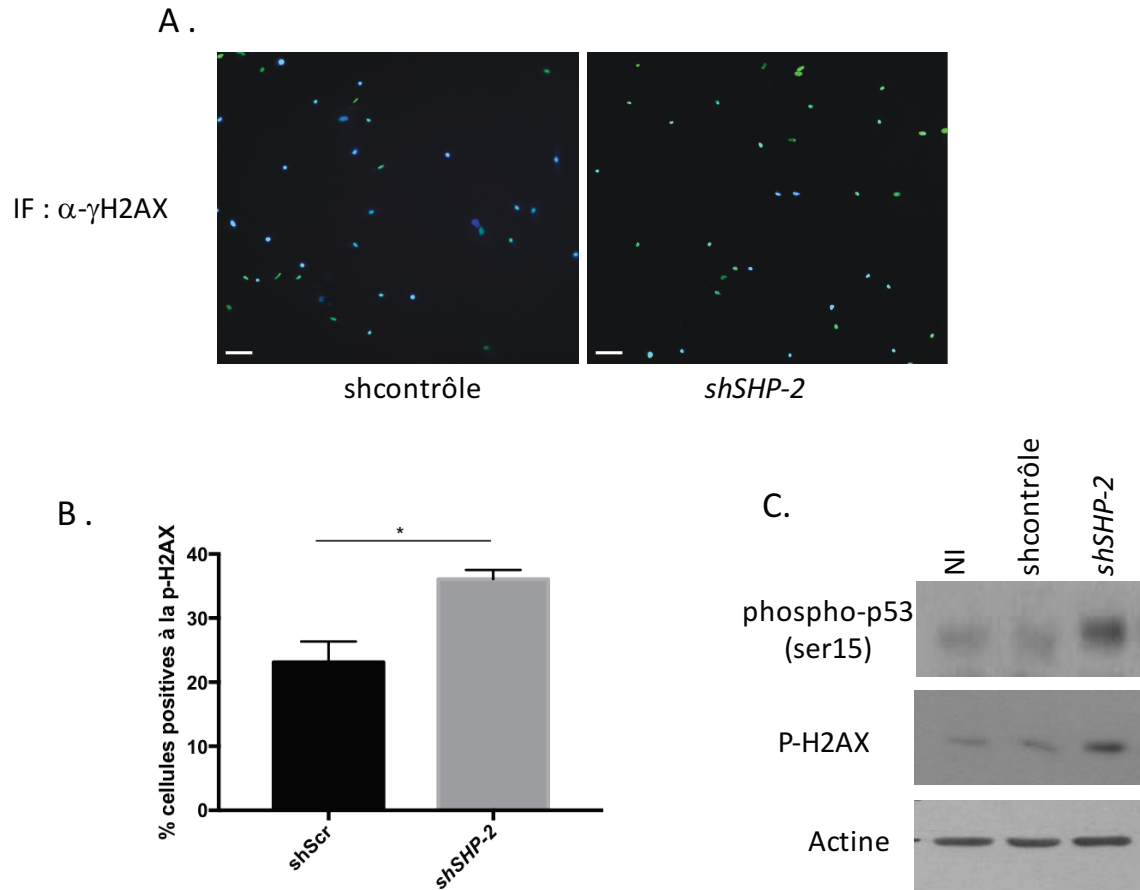
Nous avons donc tenté de déterminer par quelle voie la baisse d'expression de SHP-2 pouvait engendrer de la sénescence. Nous avons analysé les deux voies classiques de la sénescence cellulaire, soit la voie de ARF/p53 et la voie de p16 (Campisi *et al.*, 2007). Les résultats que nous avons obtenus par immunobuvardage démontrent qu'il y a une augmentation des niveaux protéiques de ARF dans les cellules exprimant un shARN dirigé contre SHP-2, une légère baisse de Mdm2 et une modeste augmentation de p53 ; cependant il n'y a pas de modulation de p21 (Figure 4A). Par la suite, nous avons analysé la voie de p16, mais peu de modulation a été observée dans le niveau protéique de p16 (Figure 4B) suggérant que cette voie n'est probablement pas impliquée dans la sénescence induite par la baisse d'expression de SHP-2. Par contre, la phosphorylation de pRB est bien diminuée, ce qui corrèle avec la baisse de prolifération.



**Figure 4 : Impact de la baisse d'expression de SHP-2 sur le niveau d'activation des voies ARF et p16-dépendantes.**

Immunobuvardage contre différentes protéines des voies de sénescence classiques dépendantes de ARF et p16. Les niveaux protéiques de ARF, mdm2, p53 et p21 (**A**) ainsi que de p16 et phospho-pRb (**B**) ont été analysés dans des lysats de cellules HIEC exprimant de manière stable un shARN dirigé contre SHP-2 ou un shARN contrôle. L'immunobuvardage contre l'actine a servi de contrôle de dépôt. Expérience représentative de N=3.

Comme la sénescence peut être aussi induite par des lésions à l'ADN, nous avons aussi analysé certains effecteurs caractéristiques de cette voie soient la présence de  $\gamma$ -H2AX et la phosphorylation de p53 sur la sérine 15. Nous avons effectué une immunofluorescence dirigée contre  $\gamma$ -H2AX et compté le nombre de cellules positives. Comme nous pouvons le voir dans l'immunobuvardage de la Figure 5A et B, nos résultats démontrent qu'il y a bel et bien une augmentation significative de la  $\gamma$ -H2AX dans les cellules HIEC<sup>ΔSHP-2</sup> ce qui est aussi supporté par une augmentation du niveau protéique en immunobuvardage (Figure 5C). De manière intéressante, une augmentation de la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 est aussi observée dans les cellules sous-exprimant SHP-2.



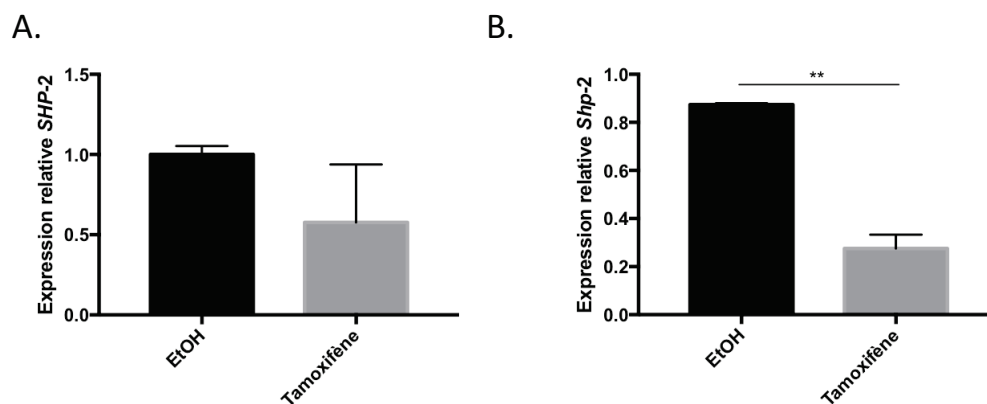
**Figure 5 : La baisse d'expression de SHP-2 induit des dommages à l'ADN dans les HIEC.**

**A.** Immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de H2AX (vert) dans des cellules HIEC exprimant un shARN dirigé contre SHP-2 ou un shARN contrôle après 10 jours en culture cellulaire. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** Le nombre des cellules positives pour la phosphorylation de H2AX (vert) a été calculé par rapport au nombre total de cellules marquées au DAPI (bleu). Le pourcentage est représenté sur le graphique. Student's t-test \* $p < 0,005$ . Le graphique représente la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. **C.** Immunobuvardage pour mesurer les niveaux de la phosphorylation de H2AX sur la sérine 139 ainsi que la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 dans des lysats de cellules HIEC exprimant de manière stable un shARN dirigé contre SHP-2 ou un shARN contrôle. L'immunobuvardage contre l'actine a servi de contrôle de dépôt. N=3

## 2. La délétion de SHP-2 inhibe le développement des organoïdes intestinaux.

### 2.1 Entéroïdes

Pour la culture d'entéroïdes, des souris SHP-2 *floxées* ont préalablement été croisées avec des souris *Vilaine-Cre-ERT2* (*Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>*), ce qui permet d'exprimer la Cre recombinase spécifiquement dans l'épithélium intestinal et d'induire son activité au moment voulu grâce au tamoxifène (Schéma 1 dans la section Matériel et méthodes). Des cryptes ont été isolées du jéjunum de ces souris et mises en culture afin de générer des entéroïdes *ex vivo*. Après deux jours de culture, le tamoxifène a été ajouté ou bien l'éthanol comme contrôle. Afin de valider notre modèle, nous avons mesuré les niveaux d'expression des transcrits de *SHP-2* dans nos entéroïdes traités au tamoxifène à 48 et 72 heures (Figure 6). Comme le démontrent nos analyses par PCR quantitatif (Figure 6B), nous avons observé une diminution significative de l'ARNm de *SHP-2* à 72 heures suite à l'ajout de tamoxifène dans le milieu de culture.



**Figure 6 : Analyse de l'expression de Shp-2 dans les entéroïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités au tamoxifène.**

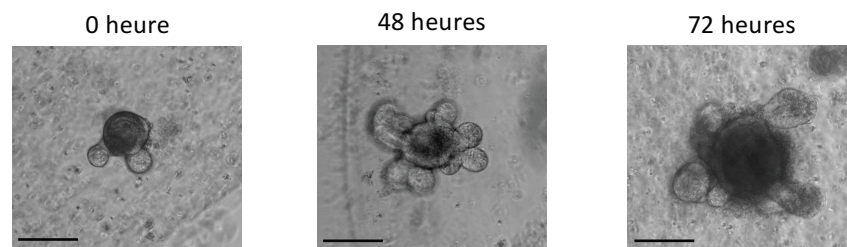
Expression en ARNm de *Shp-2* à 48 heures (A) et 72 heures (B) suite à l'ajout du tamoxifène dans le milieu de culture des entéroïdes. Normalisation de l'expression de *Shp-2* sur l'expression de gènes de référence *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*, N=3. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. Student's t-test \*\*p<0,01

D'un point de vue développemental, on peut voir que les entéroïdes dérivés des souris contrôles et des souris *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* sont semblables avant l'ajout de l'éthanol ou du tamoxifène (Figure 7).

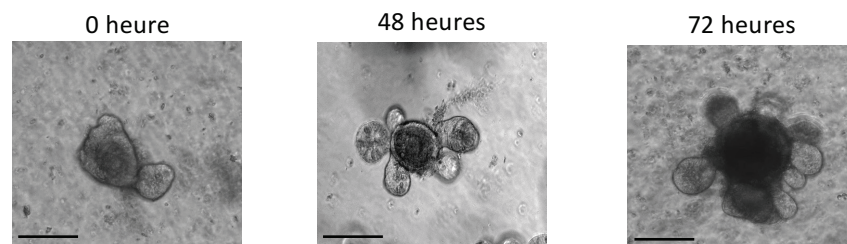


De plus, l'ajout d'éthanol dans le milieu de culture n'interfère pas avec la croissance des entéroïdes et ce, jusqu'à 7 jours de culture (Figure 7A et C). De manière intéressante, à 72h, les entéroïdes expérimentaux traités avec du tamoxifène présentent une différence morphologique flagrante avec les entéroïdes traités à l'éthanol (Figure 7D versus 7B). En effet, les entéroïdes traités au tamoxifène semblent accumuler des débris cellulaires ou des résidus dans la lumière (Figure 7D, voir flèche). Après 72h, la plupart des entéroïdes ont dégénéré et ne survivent pas comparativement aux entéroïdes contrôles traités au tamoxifène (résultat non montré).

A. Entéroïdes contrôles traités à l'éthanol



B. Entéroïdes contrôles traités au tamoxifène



C. Entéroïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités à l'éthanol



D. Entéroïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités au tamoxifène

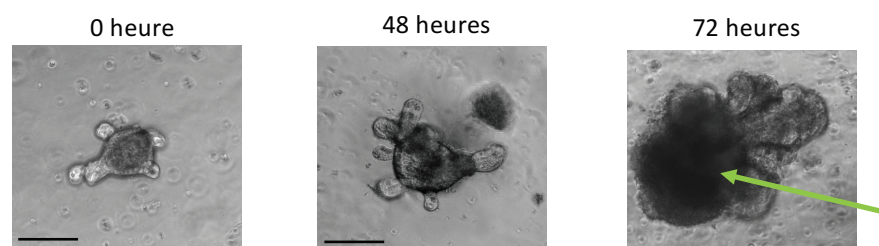
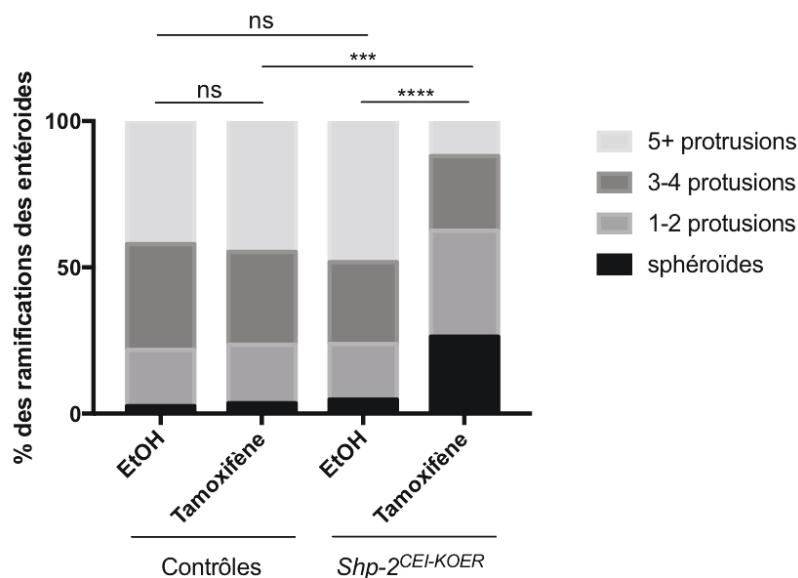


Figure 7 : La délétion de SHP-2 altère le développement des entéroïdes.

Photos représentatives en contraste de phase d'entéroïdes provenant du jéjunum de souris contrôles et expérimentales *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>*. Les entéroïdes ont été cultivés pendant 48 heures, suite à cela il y a eu l'ajout d'éthanol dans le milieu comme contrôle ou bien l'ajout de tamoxifène pour obtenir la délétion de Shp-2. La croissance des entéroïdes a été suivie pour 0, 48 et 72 et 96 (non montré) heures suivant l'ajout du traitement. Barre de grossissement 100  $\mu$ m. **A.** Entéroïdes contrôles traités à l'éthanol. **B.** Entéroïdes contrôles traités au tamoxifène. **C.** Entéroïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités à l'éthanol. **D.** Entéroïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités au tamoxifène. La flèche indique l'accumulation de résidus dans la lumière. N=3.

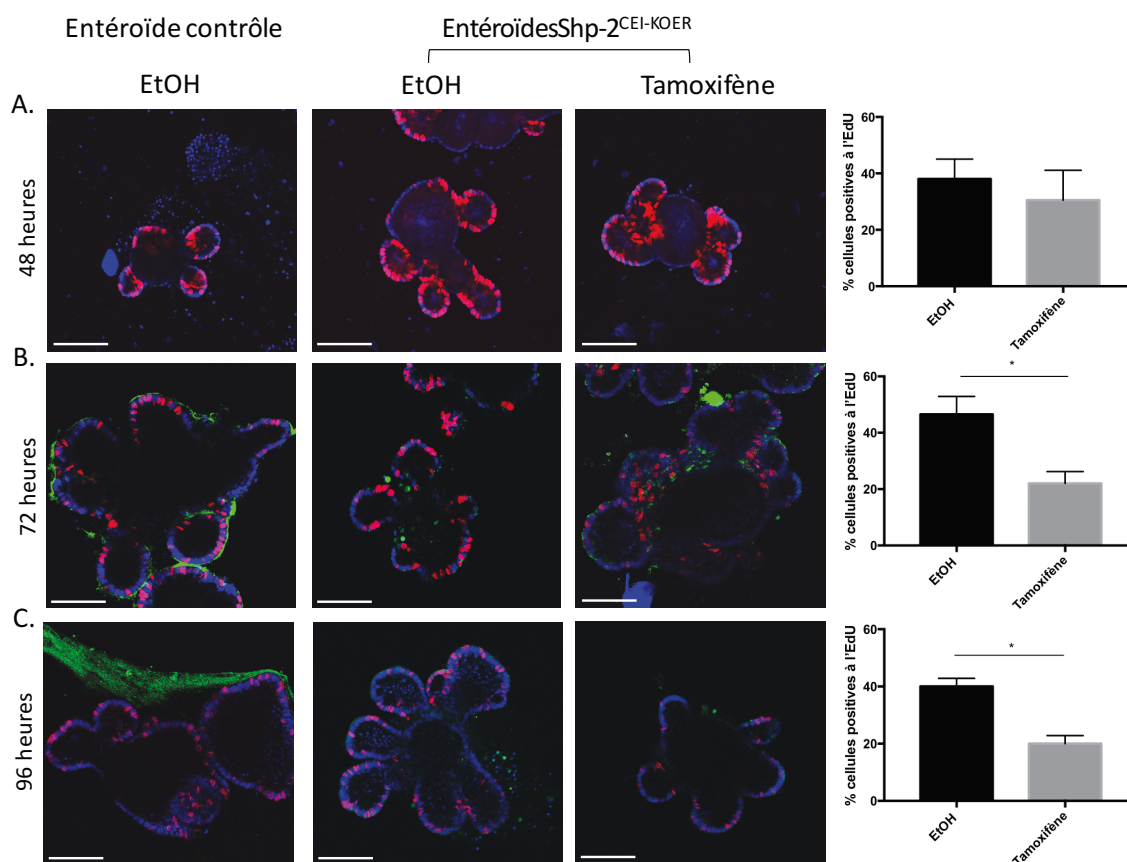
Afin de quantifier le développement des entéroïdes suite à l'ajout d'éthanol ou bien de tamoxifène dans le milieu de culture, un décompte des protrusions a été effectué à 96 heures. Comme le démontre la Figure 8, la délétion de SHP-2 inhibe clairement le développement des protrusions des entéroïdes.



**Figure 8 : La délétion de Shp-2 inhibe le développement des entéroïdes.**

Des entéroïdes ont été cultivés pendant 48 heures, suite à cela il y a eu l'ajout d'éthanol dans leur milieu de culture comme contrôle ou bien l'ajout de tamoxifène pour obtenir la délétion de Shp-2. Le nombre de protrusions par entéroïde a été compté à 96 heures après l'ajout du traitement. N=3 \*\*\*p<0,001, \*\*\*\* p<0,0001. Graphique de contingence d'une expérience représentative.

Suite à ces résultats, nous avons fait une analyse d'incorporation à l'EdU dans les entéroïdes afin de dénombrer les cellules en phase S du cycle cellulaire. Bien qu'une diminution du nombre de cellules positives commence à être visible à 48 heures (Figure 9A), cette diminution devient significative seulement au temps 72 (Figure 9B) et 96 heures (Figure 9C) dans les entéroïdes ayant une baisse d'expression de SHP-2 en comparaison aux entéroïdes contrôles suite à l'ajout du tamoxifène dans le milieu. Rappelons néanmoins qu'à 96h, peu d'organoides survivent à la délétion de SHP-2.

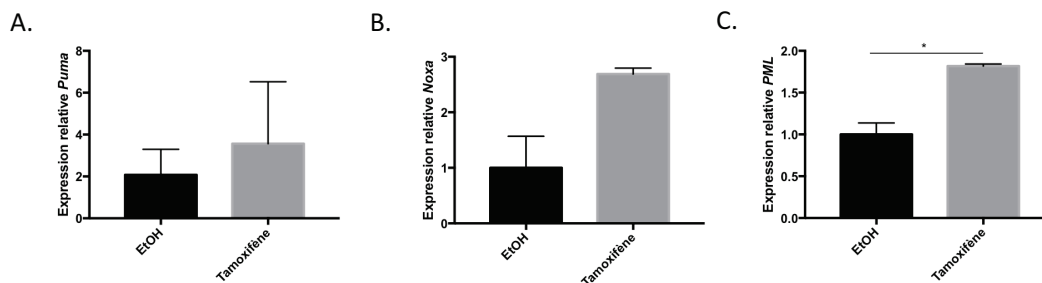


**Figure 9 : La délétion de Shp-2 inhibe la prolifération des entéroïdes.**

Photos représentatives en microscopie confocale. Les entéroïdes ont été cultivés pendant 48 heures, suite à cela il y a eu l'ajout d'éthanol dans le milieu comme contrôle ou bien l'ajout de tamoxifène pour obtenir la délétion de SHP-2. Une incorporation à l'EdU a été réalisée après 48 (A), 72 (B) et 96 (C) heures de traitement, puis les noyaux ont été marqués au Hoechst. Barre de grossissement 100 µm. Le nombre des cellules positives à l'EdU (roses) a été calculé par rapport

au nombre de cellules totales (bleues) par protrusion dans chacun des entéroïdes. Le pourcentage de cellules prolifératives pour chacune des conditions est représenté par les graphiques. N=3. \* $p < 0,005$ . Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

Des analyses de PCR quantitatif ont été réalisées sur les entéroïdes *Shp-2*<sup>CEI-KOER</sup> traités ou non au tamoxifène pendant 48 heures (Figure 10) afin de voir si la dégénérescence pouvait être associée à de l'apoptose et/ou de la sénescence. Des gènes cibles de p53 et dont l'induction est associée à la mort cellulaire et la sénescence ont été d'abord analysés. Selon les résultats obtenus, nous avons observé une augmentation, mais encore non significative, de l'expression de *Puma* (Figure 10A) et *Noxa* (Figure 10B). De manière intéressante, l'expression de *Pml* (Figure 10C) est quant à elle augmentée significativement après 72 heures dans les entéroïdes ayant une baisse d'expression de Shp-2 en comparaison aux contrôles.

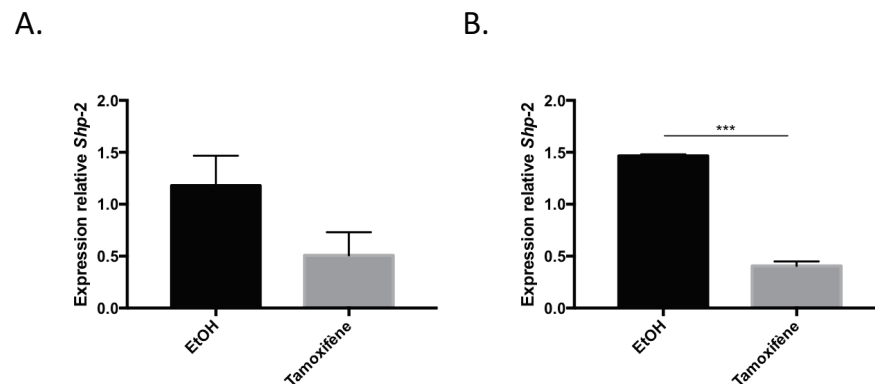


**Figure 10 : La délétion de Shp-2 module l'expression de gènes-cibles de p53.**

Expression des transcrits de *Puma* (A), *Noxa* (B) et *Pml* (C) analysée en qPCR sur des extraits d'entéroïdes de souris *Shp-2*<sup>CEI-KOER</sup> traitées ou non avec du tamoxifène pendant 72 heures pour obtenir la délétion de Shp-2. L'expression de ces gènes a été normalisée sur l'expression des gènes de référence *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. N=3 Student's t-test \* $p < 0,05$ .

## 2.2 Colonoïdes

Pour la culture de colonoïdes, des cryptes ont été isolées du côlon de souris *Shp-2*<sup>CEI-KOER</sup> et de souris contrôles, mises en culture et traitées avec du tamoxifène ou l'éthanol. Afin de valider notre modèle, nous avons confirmé la baisse d'expression de *Shp-2* par analyse en PCR quantitatif dans les colonoïdes traités au tamoxifène pour 48 heures et 72 heures (Figure 11).



**Figure 11 : Analyse de l'expression de *Shp-2* dans les colonoïdes *Shp-2*<sup>CEI-KOER</sup> traités au tamoxifène.**

Expression des transcrits de *Shp-2* après 48 heures (A) et 72 heures (B) analysée en qPCR sur des extraits de colonoïdes dérivés de souris *Shp-2*<sup>CEI-KOER</sup> traitées soit à l'EtOH ou bien au tamoxifène et normalisée sur l'expression des gènes de référence *Psmc4*, *Pum1* et *Tbp*. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. N=3, Student's t-test \*\*\*p<0,001.

Du point de vue développemental, les colonoïdes contrôles (Figure 12A) et les colonoïdes *Shp-2*<sup>CEI-KOER</sup> (Figure 12C) traités avec de l'éthanol seulement se sont bien développés après 5 jours de culture comparativement aux colonoïdes *Shp-2*<sup>CEI-KOER</sup> (Figure 12D) traités au tamoxifène et ayant une baisse d'expression de *Shp-2* qui semblent moins bien se développer. J'ai donc effectué une analyse de la taille des colonoïdes afin de quantifier le retard de croissance observé. À 24 heures suivant l'ajout du tamoxifène dans le milieu de culture (Figure 13A), il ne semble pas y avoir de diminution de la taille des colonoïdes. Cependant à 48 heures (Figure 13B), les colonoïdes expérimentaux ont une diminution de leur taille qui est significative en comparaison aux contrôles.

**A. Entéroïdes contrôles traités à l'éthanol**



**B. Entéroïdes contrôles traités au tamoxifène**



**C. Entéroïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités à l'éthanol**



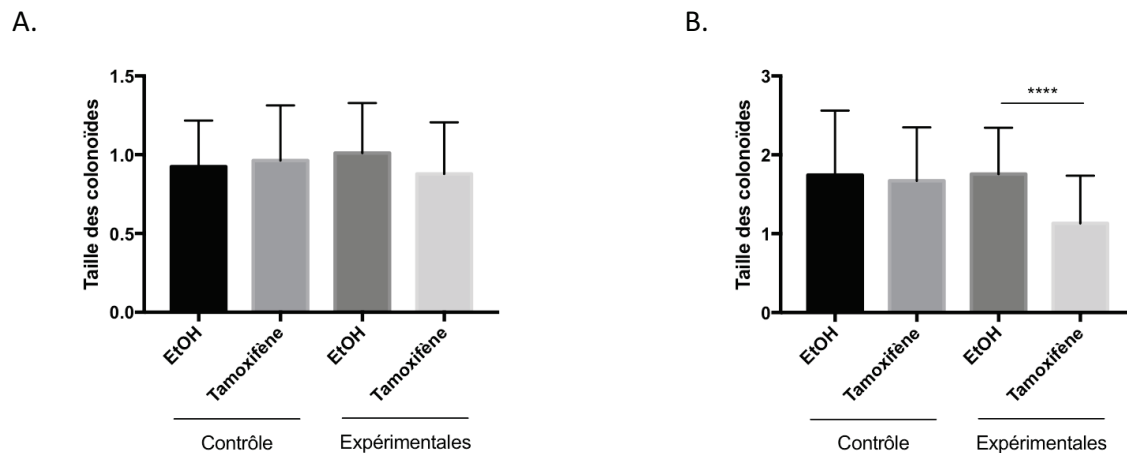
**D. Entéroïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités au tamoxifène**



**Figure 12 : La délétion de *Shp-2* dans les colonoïdes ralentit leur croissance.**

Photos représentatives en contraste de phase de colonoïdes provenant de côlon de souris contrôles et *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>*. Les colonoïdes ont été cultivés pendant 48 heures et suite à cela, l'éthanol a été ajouté dans le milieu de culture comme contrôle ou le tamoxifène a été ajouté pour 0, 24 et 48 heures afin d'induire la délétion de *Shp-2*. Barre de grossissement 100  $\mu\text{m}$ . **A.** Colonoïdes contrôles traités à l'éthanol. **B.** Colonoïdes contrôles traités au tamoxifène. **C.** Colonoïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités à l'éthanol. **D.** Colonoïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités au tamoxifène. N=3

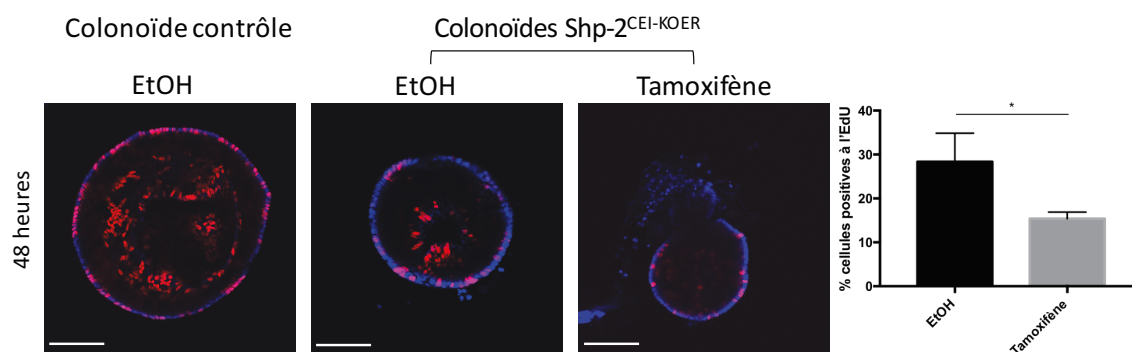




**Figure 13 : La délétion de Shp-2 réduit la taille des colonoïdes en culture.**

Les colonoïdes ont été cultivés pendant 48 heures et suite à cela, l'éthanol a été ajouté dans le milieu de culture comme contrôle ou le tamoxifène pour 24 heures (A) ou 48 heures (B) afin d'obtenir la délétion de Shp-2. Suite à cela, la taille des colonoïdes a été calculée à l'aide de ImageJ. N=3 Student's t-test \*\*\*\* p<0,0001.

Suite à ces résultats, nous avons fait une analyse d'incorporation à l'EdU dans les colonoïdes et avons vu qu'il y avait une diminution du nombre de cellules positives à l'EdU dans les colonoïdes ayant la baisse d'expression de Shp-2 à 48 heures (Figure 14).



**Figure 14 : La délétion de Shp-2 dans les colonoïdes diminue le nombre de cellules prolifératives.**

Photos représentatives en microscopie confocale. Les colonoïdes ont été cultivés pendant 48 heures et suite à cela, l'éthanol a été ajouté dans le milieu comme contrôle ou le tamoxifène pour

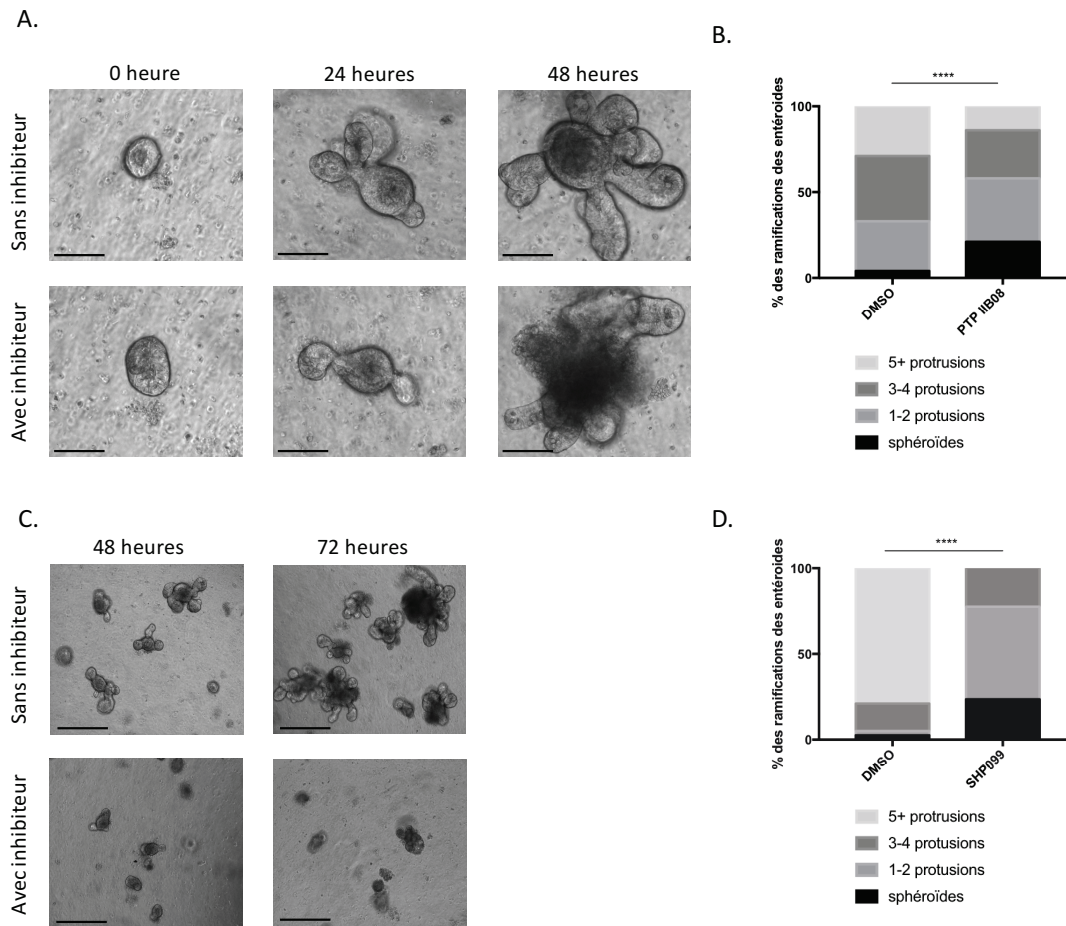
obtenir la délétion de Shp-2. Une incorporation à l'EdU a été réalisée après 48 heures de traitement, puis les noyaux ont été marqués au Hoechst. Barre de grossissement 100  $\mu\text{m}$ . Le nombre de cellules EdU positives (roses) a été calculé par rapport au nombre total de cellules (bleues) formant les colonoïdes. Le pourcentage de cellules prolifératives est représenté sur le graphique. N=3 Student's t-test \* $p < 0,005$ . Le graphique représente la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

Suite à ces résultats, nous avons décidé de passer nos colonoïdes qui avait été traités ou non au tamoxifène afin de les expandre et de mesurer leur potentiel de survie. Il a été possible de voir que suite au passage, les colonoïdes *Shp-2<sup>CEI-KOER</sup>* traités à l'éthanol ont bien repris leur croissance ; cependant ceux traités au tamoxifène n'ont pas réussi à reprendre une croissance (résultats non montrés). Donc, la délétion de Shp-2 suite à l'induction au tamoxifène affecte le potentiel régénératif des colonoïdes.

### **3. L'inhibition pharmacologique de SHP-2 altère le développement des organoïdes intestinaux.**

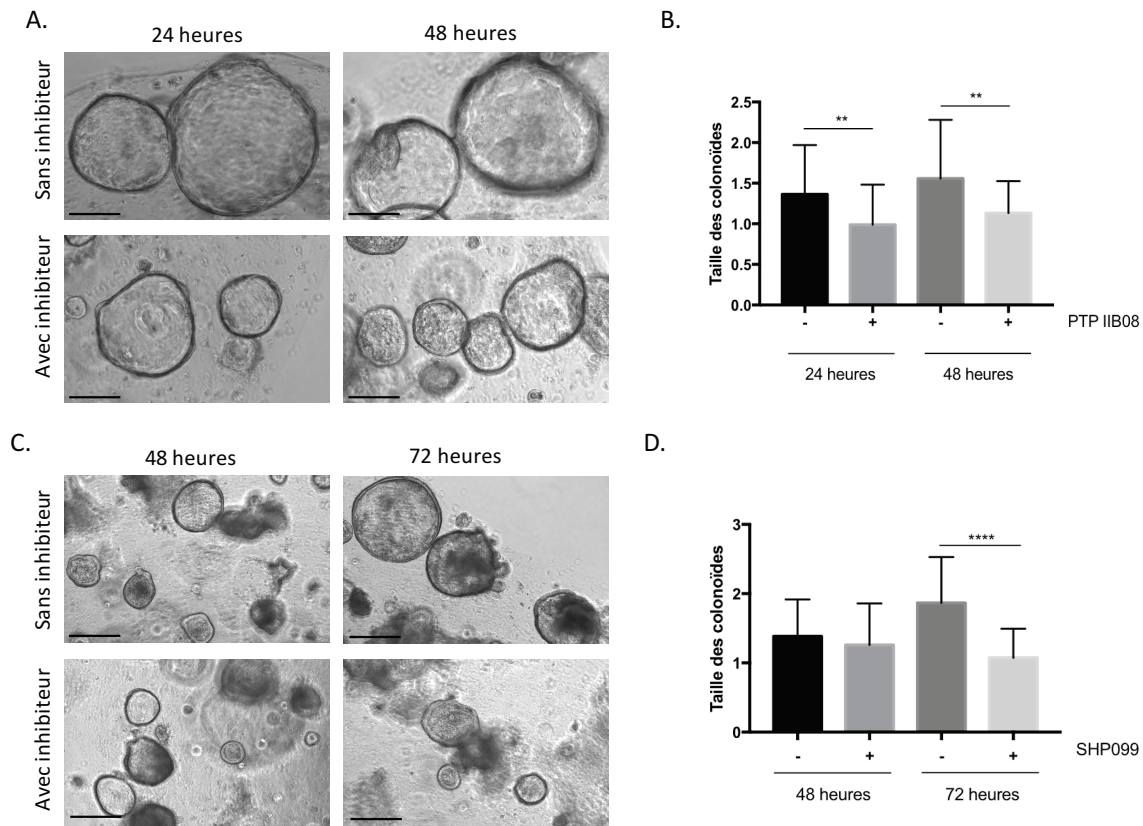
Afin de vérifier si l'inhibition pharmacologique de SHP-2 avait les mêmes effets que sa délétion génétique, nous avons utilisé deux inhibiteurs de SHP-2 : le PTP IIB08, un inhibiteur non compétitif réversible (Bunda et al., 2015) et le SHP099, un inhibiteur allostérique qui verrouille SHP-2 dans sa conformation auto-inhibée (Chen *et al.*, 2016). Le SHP099 a été identifié et caractérisé comme une petite molécule inhibitrice qui se lie de manière allostérique à une poche de type tunnel formée par la confluence des trois domaines de Shp-2. Sa liaison à Shp-2 bloque la phosphatase dans une conformation inactive. De manière intéressante, il montre une biodisponibilité orale. (Chen 2016). Le PTP IIB08 cible le domaine catalytique de Shp-2 inhibant la phosphatase de façon réversible mais non compétitive. De manière intéressante, on remarque dans les Figures 15 et 16 que l'inhibition de SHP-2 avec les deux inhibiteurs pharmacologiques ralentit clairement le développement tant des entéroïdes et des colonoïdes. On peut en effet constater une diminution du nombre de ramifications pour les entéroïdes (Figure 15) ainsi qu'une régression de la taille des colonoïdes (Figure 16). Finalement, on a aussi observé des signes de dégénérescence chez les entéroïdes traités avec les inhibiteurs de SHP-2 mais pas chez les colonoïdes.





**Figure 15 : L'inhibition pharmacologique de SHP-2 avec le PTP IIB08 ou bien avec l'inhibiteur pharmacologique de Shp-2 le SHP099 altère la croissance des entéroïdes.**

L'ajout de l'inhibiteur PTP IIB08 à une concentration de 30  $\mu$ M sur des entéroïdes dérivés de souris contrôles tandis que l'inhibiteur SHP099 est ajouté à une concentration 10  $\mu$ M aussi sur des entéroïdes dérivés de souris contrôles. **A.** Photos représentatives d'entéroïdes en contraste de phase prises après 0, 24 et 48 heures de traitement. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** Décompte du nombre de protrusions par entéroïdes 48 heures après l'ajout de l'inhibiteur dans le milieu de culture. Student's t-test \*\*  $p < 0,001$ . Le graphique de contingence choisi est représentatif de  $N=3$ . **C.** Photos représentatives d'entéroïdes en contraste de phase prises après 48 et 72 heures. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **D.** Décompte du nombre de protrusions par entéroïde 72 heures après l'ajout de l'inhibiteur dans le milieu de culture. Student's t-test \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Le graphique de contingence choisi est représentatif de  $N=3$ .



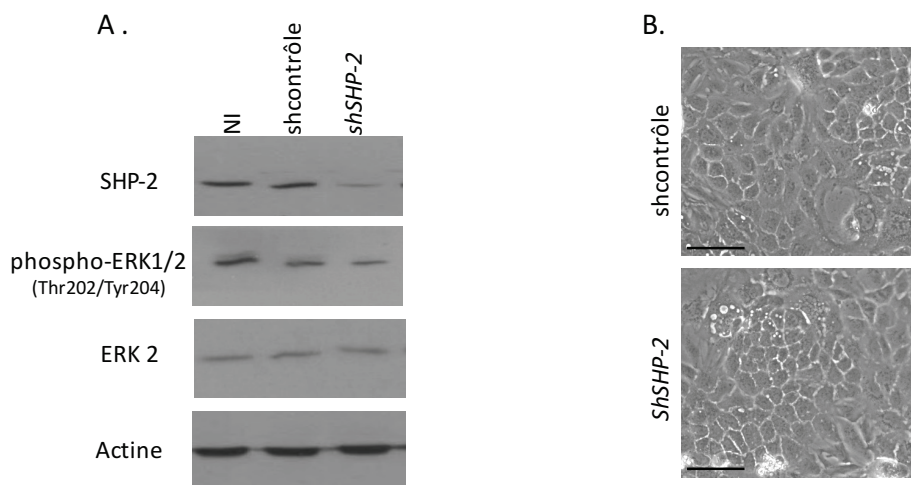
**Figure 16 : L'inhibition pharmacologique de SHP-2 avec le PTP IIB08 altère la croissance des colonoïdes.**

L'ajout de l'inhibiteur PTP IIB08 à une concentration de 30  $\mu$ M sur des entéroïdes dérivés de souris contrôles tandis que l'inhibiteur SHP099 est ajouté à une concentration 10  $\mu$ M aussi sur des entéroïdes dérivés de souris contrôles. **A.** Photos représentatives de colonoïdes en contraste de phase prises après 24 et 48 heures. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** La taille des colonoïdes a été mesurée 48 heures après l'ajout de l'inhibiteur dans le milieu de culture. Student's t-test N=3. \*\*p<0,001. **C.** Photos représentatives de colonoïdes en contraste de phase prises après 48 et 72 heures. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **D.** La taille des colonoïdes a été mesurée 72 heures après l'ajout de l'inhibiteur dans le milieu de culture. Student's t-test N=3. \*\*\*\* p<0,0001. Le graphique représente la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne.

#### 4. Impact de l'inhibition de SHP-2 dans les cellules cancéreuses colorectales

##### 4.1 Cellules Caco-2/15

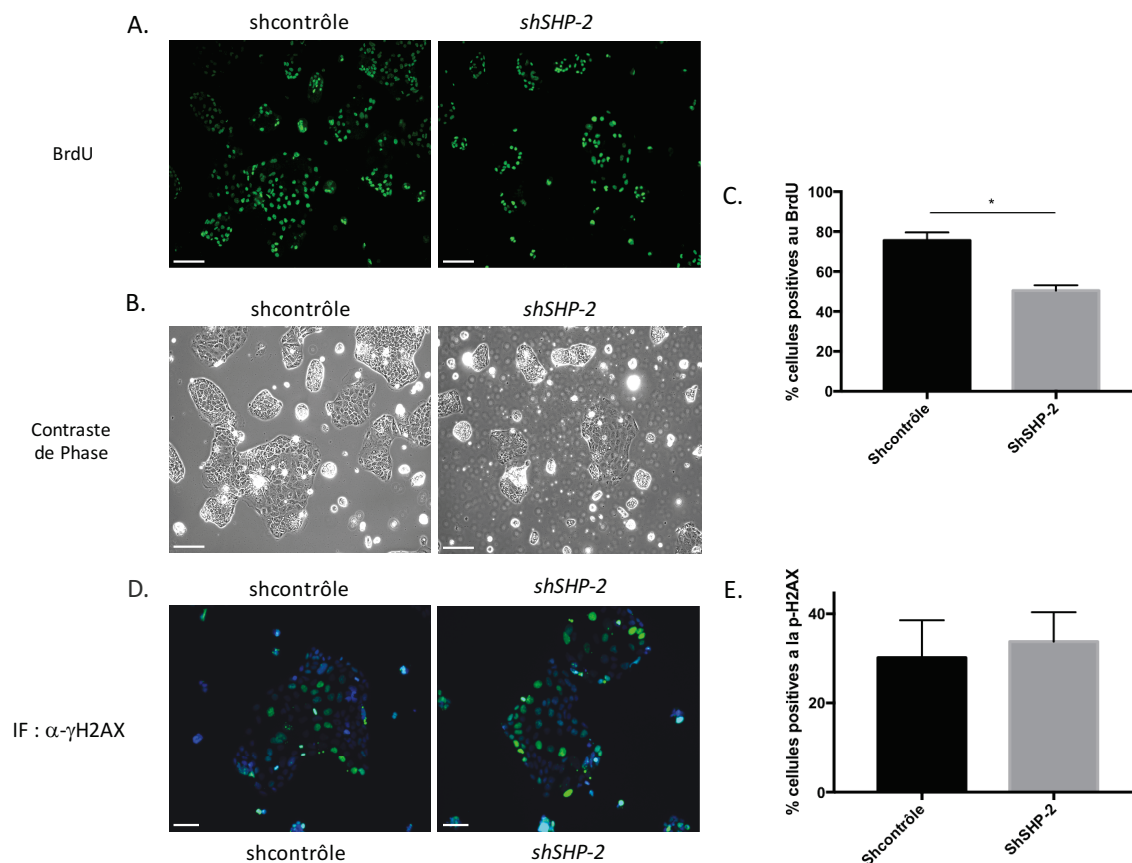
Les cellules Caco-2/15, mutées pour les gènes *APC* et *TP53* mais sauvage pour *KRAS* (Ahmed *et al.*, 2013), ont été infectées avec un lentivirus exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11*. Après sélection, la baisse d'expression de SHP-2 a été validée par immunobuvardage comme l'illustre la Figure 17A. La sous-expression de SHP-2 diminue l'activité de ERK1/2 tel qu'attendu (Figure 17A). Contrairement aux cellules normales HIEC, les cellules Caco-2/15 exprimant un shARN contre *PTPN11* ne semblent pas subir de changement de morphologie et ce, même si nous les maintenons après plusieurs passages en culture cellulaire (Figure 17B).



**Figure 17 : L'inhibition d'expression de SHP-2 dans les cellules cancéreuses Caco-2/15 n'altère pas leur morphologie.**

**A.** Immunobuvardage contre SHP-2 et la forme phosphorylée des ERK1/2 (T202/Y204) dans des lysats de cellules Caco-2/15 non infectées (NI) ou exprimant de manière stable un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle. L'immunobuvardage contre l'actine et ERK2 a été effectué en guise de contrôle de dépôt. **B.** Photos représentatives prises en microscopie en contraste de phase de cellules exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle après 15 jours en culture cellulaire. Barre de calibration 100 μm. N=3.

Toutefois, suite à une incorporation du BrdU dans les Caco-2/15, nous avons observé une diminution du nombre de cellules en phase S dans la population sous-exprimant SHP-2 (Figure 18A-C). Puisque dans les HIEC la diminution de prolifération observée a été associée à un phénotype de sénescence induit par des dommages à l'ADN, nous avons fait une immunofluorescence à l'aide d'un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée de H2AX. Nos résultats ont cependant démontré qu'il ne semble pas y avoir d'augmentation du marquage de la  $\gamma$ -H2AX entre les cellules Caco-2/15 contrôles et les cellules exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* (Figure 18D-E).



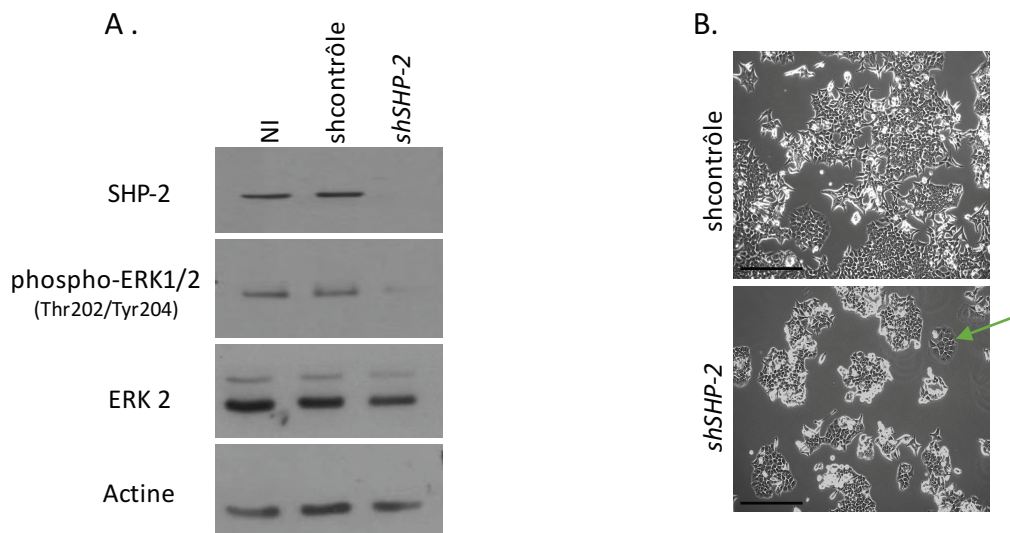
**Figure 18 : L'inhibition d'expression de SHP-2 dans les Caco-2/15 ralentit leur prolifération mais n'induit pas de dommages à l'ADN.**

**A.** Des cellules Caco-2/15 exprimant un shARN contrôle ou un shARN dirigé contre *PTPN11* ont été incubées durant 3 heures avec du BrdU. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** Photos de contraste de phase des différentes populations cellulaires contrôles et sous-exprimant SHP-2. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **C.** Le nombre de cellules BrdU positives (vert) a été calculé par rapport au

nombre total de cellules. Le pourcentage est représenté sur le graphique. N=3 Student's t-test \* $p < 0,005$ . **D.** Phosphorylation de H2AX (vert) dans des cellules exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle après 15 jours en culture cellulaire. Barre de calibration 100  $\mu\text{m}$ . **E.** Le nombre de cellules positives pour  $\gamma$ -H2AX (vert) a été calculé par rapport au nombre total de cellules marquées au DAPI (bleu). Le pourcentage est représenté sur le graphique. Les graphiques représentent la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. N=3.

#### 4.2 Cellules HCT116

Pour ce même objectif, nous avons aussi utilisé des cellules cancéreuses HCT116, puisqu'elles n'ont pas les mêmes mutations que les Caco-2/15. Les HCT116 possèdent en effet une mutation pour les gènes *CTNNB1* et *KRAS*, mais possède des allèles sauvages pour *TP53* (Ahmed *et al.*, 2013). J'ai infecté les cellules HCT116 avec les lentivirus exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle. Tout d'abord, j'ai validé la baisse d'expression de SHP-2 en immunobuvardage (Figure 19A). Tout comme précédemment montré dans les Caco-2/15, la sous-expression de SHP-2 diminue bien le niveau d'activation des kinases ERK1/2 tel qu'attendu (Figure 19A) et altère quelque peu la morphologie cellulaire en comparaison aux cellules exprimant un shARN contrôle (Figure 19B). La flèche à la figure 19B indique les cellules exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* qui présentent une morphologie quelque peu altérée. Les cellules semblent présenter un peu la morphologie large et un peu aplatie des cellules HIEC qui sont sénescents. Cependant, nous perdons ces cellules-là une fois le passage effectué, probablement parce qu'elles sont non prolifératives.

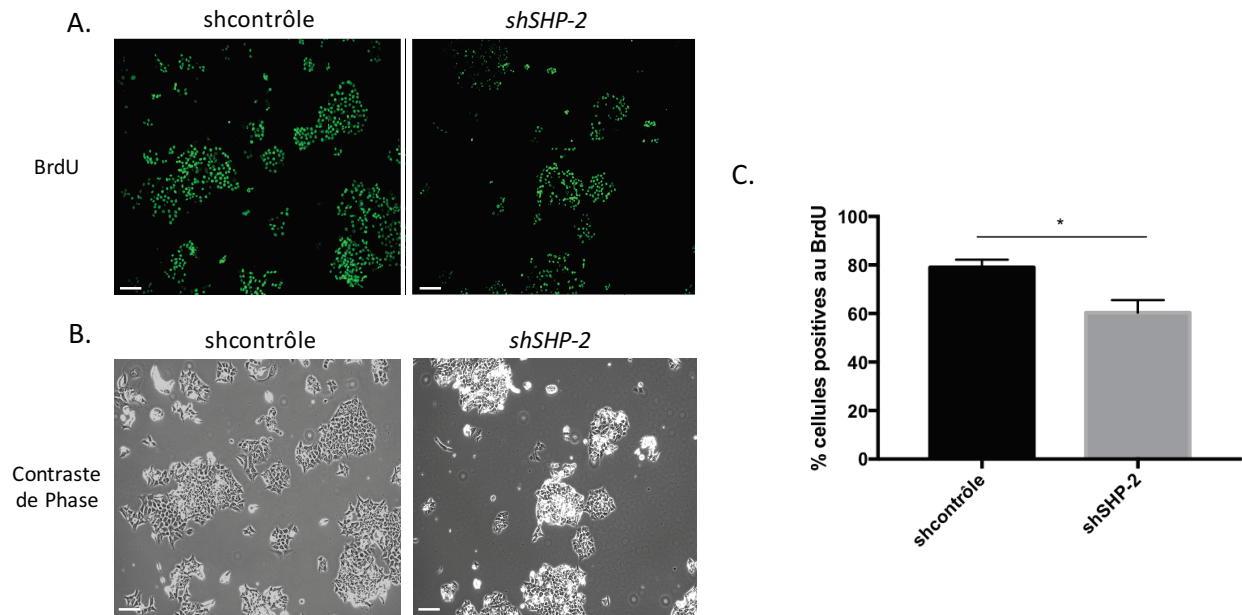


**Figure 19 : La baisse d'expression de SHP-2 dans les cellules cancéreuses HCT116 altère leur morphologie.**

**A.** Immunobuvardage contre SHP-2 et la phosphorylation des ERK1/2 (T202/Y204) dans des lysats de cellules HCT116 non infectées (NI) ou exprimant de manière stable un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle. L'immunobuvardage contre l'actine et ERK2 a été effectué en guise de contrôle de dépôt. **B.** Photos représentatives prises en microscopie en contraste de phase de cellules exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle après 5 jours en culture cellulaire. Barre de calibration 100 μm. N=3.

Suite à ces résultats, nous avons procédé à une analyse d'incorporation de BrdU dans nos populations d'HCT116 et nous avons observé qu'il y avait une diminution significative du nombre de cellules positives au BrdU chez les cellules exprimant un shARN contre *PTPN11* (Figure 20A-B-C).

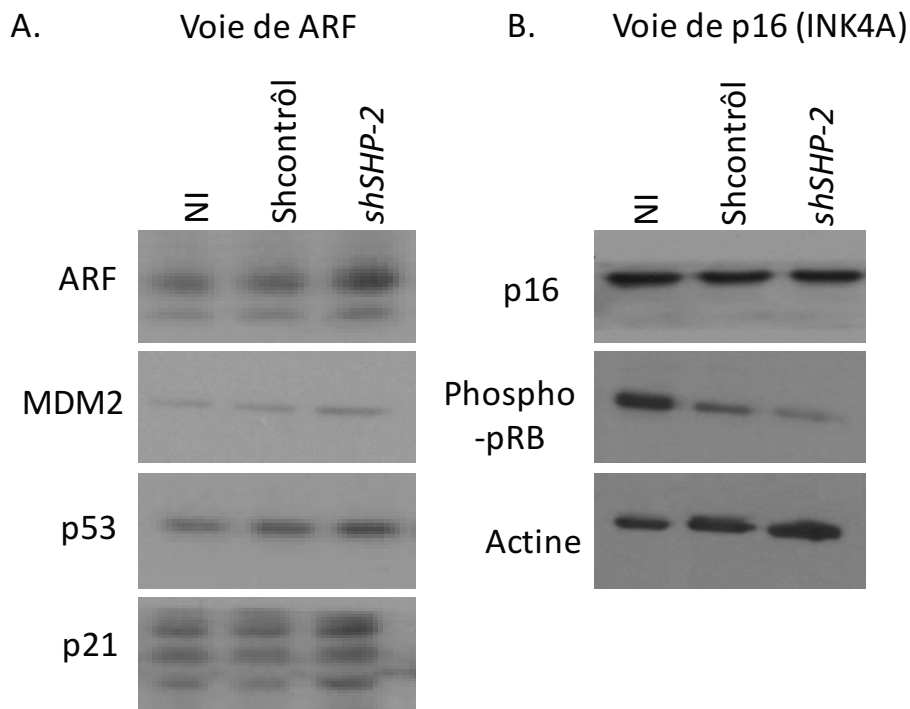




**Figure 20 : La baisse d'expression de SHP-2 dans les cellules HCT116 ralentit leur prolifération.**

**A.** Les populations des cellules shARN contrôles et *shSHP-2* ont été incubées durant 3 heures avec le BrdU suivi d'une analyse par immunofluorescence. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** Photo en contraste de phase des populations analysées. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **C.** Le nombre des cellules positives au BrdU (vert) a été calculé par rapport au nombre total de cellules. Le pourcentage est représenté sur le graphique. Student's t-test N=3 \*p<0,005.

Puisque nous avons une diminution du nombre de cellules positives au BrdU dans les HCT116 exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* et une légère modification dans la morphologie des cellules tout comme dans les HIEC, nous avons tenté d'analyser le marquage de la  $\beta$ -galactosidase associée à la sénescence. Malheureusement, dans ces cellules, nous n'avons pas réussi à mettre au point encore le marquage, les cellules étant très petites. Nous avons néanmoins analysé les voies de la sénescence dépendantes de ARF/p53 et p16 (Figure 21).



**Figure 21 : Impact de la baisse d'expression de SHP-2 sur les voies ARF/p53 et p16 dans les cellules HCT116.**

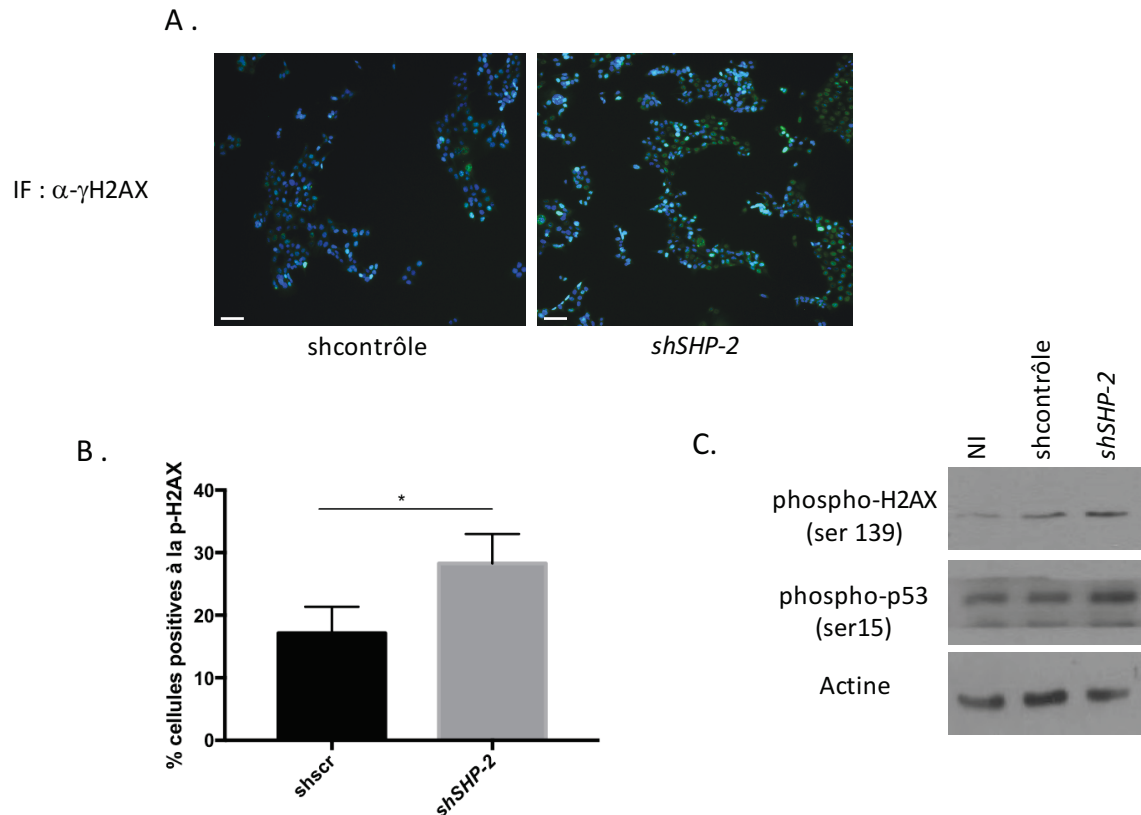
Immunobuvardage contre différents effecteurs des voies de sénescence classiques ARF et p16, dont les protéines ARF (p14), MDM2, p53, p21 (**A**) et les protéines p16 et phospho-pRB (**B**) dans des lysats de cellules HCT116 exprimant de manière stable un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle. Expérience représentative de N=3.

Concernant la voie de ARF, nous avons observé une modeste augmentation de ARF, de p53 et de p21 dans les cellules sous-exprimant SHP-2 (Figure 21A). Au niveau de la voie de p16, nous n'avons pas observé de modulation d'expression de p16. Par contre, une baisse de la phosphorylation de pRb est observée, ce qui concorde avec la baisse de prolifération que nous avons observée (Figure 21B).

Nous avons par la suite effectué une analyse par immunofluorescence et immunobuvardage de la phosphorylation de H2AX dans les HCT116 exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11*. De manière intéressante, une augmentation significative de cette phosphorylation est observée dans les cellules sous-exprimant SHP-2 (Figure 22A-C). Par immunobuvardage, nous observons aussi



l'augmentation de la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 qui est spécifique aux dommages à l'ADN (Figure 22C).



**Figure 22 : La baisse d'expression de SHP-2 induit des dommages à l'ADN dans les cellules HCT116.**

**A.** Immunofluorescence contre la forme phosphorylée de H2AX (vert) sur des cellules exprimant un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle. Barre de calibration 100  $\mu$ m. **B.** Le nombre de cellules p-H2AX positives (vert) a été calculé par rapport au nombre total de cellules marquées au DAPI (bleu). Le pourcentage est représenté sur le graphique. Student's t-test N=3 \*p<0,005. Le graphique représente la moyenne et les barres d'erreur représentent l'erreur type moyenne. **C.** Immunobuvardage contre la forme phosphorylée de H2AX sur la sérine 139 ainsi que la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 dans des lysats de cellules HCT116 exprimant de manière stable un shARN dirigé contre *PTPN11* ou un shARN contrôle. L'immunobuvardage contre l'actine a servi de contrôle de dépôt.

## Discussion

La signalisation cellulaire de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2 est très importante dans diverses réponses, puisqu'elle permet la régularisation directe de plusieurs voies de signalisation importantes comme les voies RAS/ERK, JAK/STAT et PI3K/AKT (Coulombe et al., 2015). Dans notre laboratoire divers travaux ont été effectués sur les rôles et fonctions de cette phosphatase dans les cellules épithéliales intestinales (Gagné-Sansfaçon et al., 2016 ; Coulombe et al., 2015). Tout d'abord, des travaux chez la souris ont montré que la délétion conditionnelle de SHP-2 dans l'épithélium intestinal affecte fortement l'homéostasie intestinale, particulièrement la production des cellules à mucus et de Paneth ainsi que la perméabilité paracellulaire (Coulombe et al. 2013). Ces altérations phénotypiques précèdent le développement de l'inflammation dans la muqueuse intestinale. Au contraire, l'expression d'une forme constitutive active de SHP-2 (souris *Shp-2<sup>CEI-E76K</sup>*) dans l'épithélium intestinal stimule fortement la prolifération cryptale et la fonction barrière de l'épithélium via l'augmentation du nombre et de la fonction des cellules à mucus (Gagné-Sansfaçon et al., en révision, 2018). Conséquemment, les souris *Shp-2<sup>CEI-E76K</sup>* sont résistantes à un stress inflammatoire comme le DSS ou une infection bactérienne. De plus, l'expression du mutant E76K stimule fortement la tumorigénèse intestinale chez la souris *Apc<sup>Min/+</sup>*, ce qui suggère un rôle pro-oncogénique pour cette phosphatase dans l'épithélium intestinal (Gagné-Sansfaçon et al., 2016). De manière intéressante, des mutations dans le résidue E76 ont justement été déjà observées dans des spécimens de cancers colorectaux (Bentires-Alj et al., 2004). De plus, notre laboratoire a récemment démontré que l'inhibition d'expression de SHP-2 à l'aide d'un siARN diminue significativement les propriétés tumorales des cellules cancéreuses colorectales humaines telles que la croissance en indépendance d'ancrage et l'invasion. Ainsi, ces résultats suggéraient un rôle positif pour SHP-2 dans la prolifération et l'oncogenèse colorectale. Par contre, les mécanismes d'action par lesquels SHP-2 exerçait cet effet restaient à définir.

### 1. SHP-2 prévient la sénescence dans les cellules épithéliales intestinales humaines non-immortalisées.

Afin de mieux comprendre la fonction de SHP-2 dans la prolifération cryptale intestinale, j'ai inhibé son expression à l'aide d'un shARN dans un lignée normale humaine intestinale non immortalisée, la lignée HIEC (Perreault & Beaulieu, 1996). De façon non surprenante, j'ai observé

dans les cellules sous-exprimant SHP-2, une baisse du niveau d'activation de ERK1/2, un effecteur bien connu de SHP-2 (Coulombe *et al.*, 2015). De plus, les cellules exprimant un shARN dirigé contre SHP-2 présentaient une forme beaucoup plus élargie et plate que les cellules exprimant un shARN contrôle. Cette morphologie particulière nous a rappelé la morphologie des cellules sénescences. En effet, des fibroblastes humains sénescents démontrent aussi de tels changements morphologiques (Dimri *et al.*, 1995). Suite à ces résultats, nous avons analysé l'incorporation de BrdU et nous avons vu qu'il y avait une diminution significative du nombre de cellules positives au BrdU chez les cellules exprimant un shARN dirigé contre SHP-2, suggérant l'inhibition de leur cycle cellulaire en phase G1 (Garneau *et al.*, 2009). Puisqu'il y avait une baisse de la prolifération importante dans les cellules sous-exprimant SHP-2 en comparaison aux cellules contrôles ainsi qu'un changement de morphologie important, nous avons spéculé que les cellules étaient peut-être entrées en sénescence. Nous avons donc analysé l'activité de la  $\beta$ -Galactosidase, un marqueur des cellules sénescences. De manière très intéressante, nous avons observé une augmentation de presque 50% du nombre de cellules positives à la  $\beta$ -Galactosidase dans les cellules exprimant un shARN dirigé contre SHP-2 comparativement aux cellules contrôles. Donc, la baisse d'expression de SHP-2 induit bel et bien la sénescence des cellules épithéliales intestinales normales humaines. À notre connaissance, notre étude est la première démontrant un tel rôle de SHP-2 dans le contrôle de la sénescence dans les cellules épithéliales normales.

Les inducteurs de la sénescence comprennent la suractivation oncogénique, les lésions de l'ADN, les perturbations chromatinienne, le stress oxydant et le dysfonctionnement télomérique (Collado *et al.*, 2006). Comme les HIEC sont des cellules normales (absence de mutations oncogéniques), nous avons donc vérifié si la baisse de SHP-2 induisait des dommages à l'ADN (Mallette 2007). Nous avons effectué une immunofluorescence dirigée contre la phosphorylation de H2AX, un marqueur de dommages à l'ADN. Nous avons effectivement observé une augmentation significative d'environ 20% du nombre de cellules positives pour la phosphorylation de H2AX dans les cellules sous-exprimant SHP-2 en comparaison aux cellules contrôles. Ces résultats suggèrent donc que SHP-2 prévient l'apparition de dommages à l'ADN dans les cellules normales. Quelques études réalisées dans d'autres types cellulaires ont déjà observé un lien entre SHP-2 et les dommages à l'ADN, notamment dans les études de Yuan *et al.*, (2003) et de Tsang *et al.*, (2012) que j'explique plus loin dans la discussion.

Il a été mis en évidence que les lésions à l'ADN provoquent l'activation des kinases ATM/ATR, qui mène à la phosphorylation de p53 sur la sérine 15 (Nardella et al., 2011). Dans les HIEC sous-exprimant SHP-2, j'ai observé une augmentation forte de la phosphorylation de p53 sur la sérine 15, ainsi qu'une forte augmentation de la phosphorylation de H2AX sur la sérine 139. Ces résultats confirment la présence de dommages à l'ADN et l'activation probable des kinases ATM/ATR. Ces expériences sont en cours actuellement dans le laboratoire de la Pre Rivard. Il serait aussi possible de moduler mes propos et ajouter qu'on devrait faire d'autres expériences pour être certain qu'il s'agisse bien de dommages à l'ADN associés à la perte de SHP-2. Le test des comètes est un moyen efficace de détection des ruptures simple et double brin. La méthode tire parti de la migration différentielle de l'ADN dans un champ électrique dû à des différences de quantités de dommages de l'ADN (Olive 2006).

Suite à ces résultats, nous avons d'abord analysé les deux voies classiques d'induction de la sénescence cellulaire soient la voie de ARF et la voie de p16 (Boucher et al., 2004 ; Lan et al., 2015 ; Sturla, 2011). Dans nos analyses par immunobuvardage, nous avons observé une augmentation claire de ARF, une légère augmentation de p53 et une légère baisse de MDM2 dans les cellules exprimant un shARN dirigé contre SHP-2 ; cependant, il n'y a pas de modulation de p21 dans les cellules sous-exprimant SHP-2. L'absence de modification de p21 est particulièrement surprenante étant donné l'augmentation, quoique modeste, de p53 et l'inhibition du cycle cellulaire. Rappelons que nous avons effectué ces analyses à un temps donné sur des populations stables sous-exprimant SHP-2. Il est possible que l'expression de p21 ait été augmentée à des temps plus précoces et qu'au moment, où nous avons lysé, cette augmentation ne soit plus détectable. Cela dit, d'autres gènes connus pour être induits par p53 (*BTG2*, *BTG3*, *ZNF385A*, etc.) sont également capables d'inhiber la prolifération cellulaire (Valente et al., 2018). À noter, une augmentation de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27 a été observée. Celle-ci est probablement dû à l'inhibition des kinases ERK1/2. En effet, notre groupe a déjà rapporté que la dégradation de p27 en réponse au mitogènes est dépendante de l'activation de la voie MAPK/ERK dans les cellules épithéliales intestinales (Rivard et al., 1999). Nous avons aussi analysé la voie de p16. P16 est un inhibiteur du cycle cellulaire qui bloque les CDK4 et CDK6 associées aux cyclines D, ce qui inhibe la phosphorylation de la protéine Rb et donc arrête le cycle cellulaire en G1 (Nardella et al., 2011). La baisse d'expression de SHP-2 dans les cellules HIEC, altère peu

l'expression de p16, suggérant que cet inhibiteur n'est pas impliqué dans la sénescence de ces cellules.

Des résultats précédents de notre laboratoire ont montré que les HIEC entraient en sénescence prématurée suite à l'hyperactivation de la voie ERK par l'expression d'une forme constitutive active de MEK1. Cette sénescence, induite par le stress oncogénique de l'hyperactivation de la voie MAPK, était caractérisée par une augmentation de l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire p53, p21 et p16 (Boucher et al., 2004). Au contraire, mes résultats présentés ici montrent que l'inhibition de SHP-2 diminue le niveau d'activation des kinases ERK1/2 et induit la sénescence. Ainsi, autant l'hyperactivation que l'inhibition des ERK1/2 peut être associée à la sénescence dans les HIEC. D'autres voies de signalisation pro-oncogéniques comme les voies Wnt/ $\beta$ -caténine (Xu et al., 2008), PI3K/Akt (Bent et al., 2016) et JAK/Stat3 (Kojima et al., 2013) sont capables d'induire la sénescence lorsqu'hyperactivées. De manière intéressante, une analyse préliminaire du niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine (reflet de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine) et de la phosphorylation de Stat3 (reflet de la voie JAK/Stat) montre une augmentation des niveaux protéiques de la  $\beta$ -caténine et de phospho-Stat3 dans les HIEC sous-exprimant SHP-2 (résultats non montrés). Même s'ils doivent être validés, ces résultats suggèrent que l'inactivation de SHP-2 dans les HIEC pourrait induire un stress oncogénique via l'hyperactivation des voies Wnt et Stat3, deux voies qui lorsqu'hyperactivées peuvent conduire à la sénescence (Xu et al., 2008 ; Kojima et al., 2013). Des expériences sont en cours pour vérifier cette hypothèse.

## **2. L'inactivation génétique ou pharmacologique de SHP-2 inhibe le développement et la survie des entéroïdes *ex vivo*.**

Nous avons voulu par la suite analyser l'impact de l'inhibition de SHP-2 dans un modèle intestinal plus relevant, les entéroïdes, un modèle qui permet la croissance, l'expansion et la différenciation des cellules épithéliales intestinales à partir des cellules souches. Des cryptes de souris ont été isolées et mises en culture en présence de matrigel et différents constituants reconstituant la niche intestinale (Sato et al., 2011). Pour ces expériences, j'ai utilisé un modèle de souris issu du croisement de la souris dont le gène SHP-2 est floxé avec la souris *Viline Cre-ERT2*, qui expriment une Cre recombinase qui est inductible au tamoxifène et ce, spécifiquement dans les cellules

épithéliales intestinales au moment désiré. Nos résultats montrent que le traitement au tamoxifène diminue bien le niveau des transcrits de SHP-2 dans nos entéroïdes après 48 et 72 heures. De manière intéressante, la délétion de SHP-2 par le traitement au tamoxifène altère fortement le développement des entéroïdes (nombre de protrusions), qui changent de morphologie et dégénèrent avec le temps au contraire des organoïdes contrôles traités à l'éthanol qui continuent de se développer normalement. En fait, les entéroïdes expérimentaux dégénèrent 72h après l'ajout du tamoxifène. Suite à ces résultats, nous avons analysé la prolifération par l'incorporation de l'EdU. Nous avons observé une diminution du nombre de cellules positives à l'EdU suite au traitement au tamoxifène dans les entéroïdes expérimentaux. Dès 48 heures, il y a une tendance à la diminution des cellules positives au marquage EdU, cependant dès 72 et 96 heures il y a une diminution significative dans les entéroïdes expérimentaux traités au tamoxifène. Ces résultats indiquent que l'inhibition de la prolifération des cellules souches et/ou des cellules progénitrices pourrait être en partie responsable des problèmes de développement des entéroïdes suite à la délétion de SHP-2. Ces résultats nous rappellent aussi ceux de Lan et al. (2015) qui ont récemment rapporté que dans les mammosphères, la délétion de SHP-2 inhibait aussi fortement la prolifération (marquage au Ki67) et le nombre de mammosphères développées. Par contre, les auteurs n'ont pas observé de dégénérescence ni d'apoptose dans leurs mammosphères déficients pour l'expression de SHP-2 (Lan et al., 2015), contrairement à ce qu'on observe avec les entéroïdes.

Afin de mieux comprendre ce phénomène de dégénérescence, nous avons analysé l'expression de gènes associés à l'apoptose ainsi qu'à la sénescence. Nous avons choisi d'analyser dans un premier temps l'expression de *Noxa*, *Pml* et *Puma*, tous des gènes cibles de p53. En effet, comme nous avons observé une augmentation de p53 dans les HIEC sous-exprimant SHP-2, nous avons décidé d'investiguer dans un premier temps ces gènes cibles de ce facteur de transcription dans les entéroïdes. Effectivement, la délétion de SHP-2 par le traitement au tamoxifène semble augmenter l'expression de ces trois gènes même si pour le moment, seule l'induction de *Pml* est significative à  $p < 0,05$ . *Pml* code pour une protéine associée à la sénescence (Qian et al., 2010) ainsi que dans les voies apoptotiques dépendantes ou non de p53 (Bernardi et Pandolfi, 2007). Dans le noyau, elle se multimérise et se localise dans une structure qu'on appelle les « *Pml-nuclear bodies* » (Pml-NB). Pml est connue pour activer p53 en recrutant la protéine aux « nuclear bodies » et favorise son activation, tout en inhibant ses régulateurs tels que MDM2 ou HAUSP. L'apoptose

induite par Fas repose aussi sur les Pml-NB pour libérer l'énorme protéine associée à FLICE, qui se localise ensuite dans les mitochondries pour favoriser l'activation de la caspase-8 (Bernardi et Pandolfi, 2007). Au-delà de l'apoptose, d'autres études ont impliqué des Pml-NB dans la sénescence cellulaire, en particulier son induction. Il a été démontré que les Pml-NB étaient impliqués dans la formation de certaines caractéristiques de la chromatine chez les cellules en phase de sénescence, telles que les hétérochromatines associées à la sénescence (SAHF), qui inhibent l'expression de facteurs et de gènes favorisant la croissance. La formation de ces caractéristiques est le résultat des chaperons d'histones, HIRA et ASF1, dont les activités de remodelage de la chromatine sont ici médiées par les Pml-NB. HIRA se localise aux Pml-NB avant que toute autre interaction se produise avec l'ADN (Bernardi et Pandolfi, 2007).

Le changement morphologique observé des entéroïdes expérimentaux traités au tamoxifène est similaire au phénotype observé dans des entéroïdes apoptotiques (Takahashi *et al.*, 2014). Comme les entéroïdes délétés pour SHP-2 finissent aussi par dégénérer, cela suggère aussi qu'ils meurent par apoptose. Afin de vérifier cela, nous avons tenté de faire un marquage de la caspase-3 activée, sans succès. D'autres expériences sont nécessaires afin de mettre au point la détection de la caspase-3 activée par immunofluorescence de même que d'autres marqueurs d'apoptose comme l'ADN clivé (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling ou TUNEL) ou la caspase-7 clivée. Il serait également pertinent de valider l'augmentation de p53 dans les entéroïdes traités au tamoxifène et ce, par immunobuvardage. Le laboratoire est justement en train de mettre au point l'extraction des protéines à partir des cultures d'organoides.

Finalement, il est intéressant de constater que l'inhibition pharmacologique de SHP-2 par le PTPII08 dans les entéroïdes induit un phénotype similaire à celui induit par sa délétion génétique. L'inhibiteur PTPII08 cible spécifiquement l'activité phosphatasique de SHP-2 (Bunda *et al.*, 2015 ; Xu *et al.*, 2013) tandis que le SHP099 bloque SHP-2 dans une conformation auto-inhibée (Bunda *et al.*, 2015). Pris ensemble, ces résultats suggèrent que l'activité phosphatase de SHP-2 est importante pour le développement des entéroïdes et leur survie.

Mais quels sont les mécanismes moléculaires par lesquels l'inactivation de SHP-2 induit la dégénérescence des entéroïdes ? Tout d'abord, il faut rappeler que la voie ERK/MAPK est une voie qui est très importante pour la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Aliaga *et*

*al.*, 1999 ; Rivard *et al.*, 1999). L'activation de cette voie a aussi été montrée pour être impliquée dans le maintien des cellules souches intestinales Lgr5+ dans le cycle cellulaire. En effet, lorsque la voie ERK/MAPK est inhibée avec un inhibiteur pharmacologique de MEK, les cellules souches Lgr5+ entrent en quiescence dans un modèle d'organoïdes en culture (Basak *et al.*, 2017) ; cependant, les entéroïdes cessent de croître mais ne dégénèrent pas. Cela indique que l'inhibition seule de la voie ERK MAPK induit la quiescence mais n'est probablement pas suffisante à induire la dégénérescence des entéroïdes. Probablement que la délétion de SHP-2, en plus d'inhiber l'activité ERK, module d'autres voies de signalisation et que le déséquilibre de ces voies cause la mort cellulaire. De plus, contrairement aux HIEC où l'inhibition d'expression de SHP-2 induit la sénescence, dans les entéroïdes de souris, elle induit plutôt leur dégénérescence, probablement par apoptose même si ce dernier point reste à confirmer. Mais pourquoi une telle différence ? Si l'on compare les cellules HIEC aux entéroïdes, une différence importante (autre que l'espèce, humain versus souris) est que les entéroïdes sont composés de plusieurs types cellulaires incluant les cellules souches. Or, il a déjà été démontré que l'hyperactivation de la voie Wnt (observée dans les HIEC sous-exprimant SHP-2) sensibilise les cellules souches intestinales aux dommages à l'ADN et à l'induction de l'apoptose p53-dépendante (Tao *et al.*, 2015 ; Ishizuka *et al.*, 2003). Ainsi, il est fort possible que ce soit une apoptose des cellules souches qui provoque la dégénérescence des entéroïdes. Des analyses de co-marquage (marqueurs de cellules souches versus d'apoptose) sont en cours afin de vérifier l'hypothèse. De plus, il a été démontré dans les fibroblastes embryonnaires que SHP-2 régulait négativement l'expression d'un groupe de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose et caractérisés comme des cibles transcriptionnelles de p53 (Ruhul Amin *et al.* 2007). Une autre hypothèse possible est que chez la souris déficiente pour SHP-2 (*Shp-2<sup>CEI-KO</sup>*), il y a une forte baisse des protéines de jonctions cellule-cellule. Les jonctions sont déstructurées et donc moins fortes (Coulombe *et al.*, 2013). Par conséquent, il est possible que la structure et la cohésion des organoïdes soient fortement déstabilisées suite à la délétion de SHP-2 induite par le tamoxifène, *ex vivo*, et que ceci conduise à leur dégénérescence. Finalement, il faudrait caractériser le phénotype des cellules de Paneth suite à la délétion de SHP-2. On sait que les cellules de Paneth produisent le facteur de croissance Wnt3, indispensable au maintien et à la survie des cellules souches intestinales (Heuberger *et al.*, 2014). Des analyses sont en cours dans notre laboratoire pour vérifier si la production de ce facteur de croissance est justement altérée par la perte de SHP-2.



### **3. L'inactivation génétique ou pharmacologique de SHP-2 inhibe le développement des colonoïdes *ex vivo*.**

Nous avons aussi isolé des cryptes coloniques et vérifié en culture *ex vivo*, l'impact de la délétion de SHP-2. De façon similaire aux entéroïdes, la délétion de SHP-2 par le traitement au tamoxifène ralentit significativement le développement des colonoïdes tel que visualisé par la diminution de leur taille comparativement aux colonoïdes non traités. Cette diminution de taille est aussi associée à une diminution de la prolifération cellulaire tel que visualisé par la baisse du nombre de cellules positives à l'EdU et ce, dès 48 heures après l'ajout de tamoxifène. Comme pour les entéroïdes, l'inhibition pharmacologique de SHP-2 dans les colonoïdes induit un phénotype similaire à la délétion : une inhibition de la croissance. Contrairement aux entéroïdes, les colonoïdes ne semblent pas dégénérer et semblent donc moins sensibles à l'inhibition de SHP-2. Comment expliquer cela ? Tout d'abord, il faut se rappeler que dans le côlon le facteur Wnt3 indispensable à la survie et prolifération des cellules souches provient du mésenchyme et non, comme dans l'intestin grêle, des cellules de Paneth (absentes dans le côlon). Par conséquent, lorsqu'on met en culture des colonoïdes, le facteur Wnt3 est ajouté de façon exogène au milieu de culture. Ainsi, une hypothèse serait que l'inactivation de SHP-2 dans les cellules de Paneth de l'intestin grêle altère la production de Wnt3, affectant ainsi la survie des entéroïdes. Par contre, cette régulation serait absente dans les colonoïdes puisque le Wnt3 est ajouté de façon exogène. Une autre hypothèse pour expliquer la différence de sensibilité entre les entéroïdes et les colonoïdes est peut-être que la délétion de SHP-2 induite par la Cre recombinase est plus efficace dans les entéroïdes que dans les colonoïdes. En effet, certains travaux ont déjà rapporté que le promoteur Villine utilisé pour exprimer la Cre recombinase est plus efficace dans les cellules épithéliales intestinales du grêle comparativement à celles du côlon (Madison et al., 2002). Des expériences sont en cours pour vérifier ces hypothèses.

### **4. L'inhibition de SHP-2 induit des dommages à l'ADN dans les cellules cancéreuses colorectales HCT116 mais pas dans les Caco-2/15.**

Nous avons voulu par la suite tester l'impact de l'inhibition de SHP-2 dans les cellules cancéreuses colorectales humaines. Nous avons utilisé la lignée Caco-2/15, une lignée cellulaire mutée pour

les gènes *APC* et *TP53* mais qui exprime une forme sauvage de *KRAS*. Nous avons aussi utilisé la lignée HCT116 qui possède des mutations pour la *CTNNB1* et *KRAS* mais qui exprime la forme sauvage de *TP53*. Les deux lignées cellulaires ont été infectées avec un lentivirus exprimant un shARN dirigé contre SHP-2 pour diminuer l'expression de SHP-2. Tel qu'attendu, nous avons observé dans les deux lignées la baisse du niveau d'expression de SHP-2 et du niveau de phosphorylation de leurs effecteurs, les kinases ERK1/2. De manière intéressante, la morphologie de certaines cellules HCT116 change un peu suite à la baisse d'expression de SHP-2. Les HCT116 sous-exprimant SHP-2 prolifèrent aussi moins vite, ce qui est cohérent avec l'inhibition des ERK1/2, dont l'activation est nécessaire à la prolifération des lignées cancéreuses colorectales (Lemieux *et al.* 2009 ; Yeh *et al.*, 2009). De manière intéressante, comme dans les HIEC, cette inhibition de prolifération est associée à une augmentation des dommages à l'ADN tel que visualisé par l'augmentation du nombre de cellules positives au phospho-H2AX. De plus, une augmentation de phospho-p53 a été notée dans les cellules sous-exprimant SHP-2, suggérant là aussi une activation de la voie ATM/ATR, comme dans les cellules normales HIEC.

Dans les cellules normales, les lésions à l'ADN étaient associées à un phénotype sénescence avec une augmentation d'expression de ARF et mais pas p16. Nous avons vérifié le niveau d'expression de ces deux protéines dans les HCT116 sous-exprimant SHP-2 et nous avons observé que seul ARF est modestement augmenté. De manière parallèle, l'expression de p53 et de p21 est aussi légèrement augmentée. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à détecter de marquage positif à la  $\beta$ -galactosidase (résultats non montrés). Les cellules HCT116 étant très petites, le marquage de la  $\beta$ -galactosidase est difficile à visualiser. Nous travaillons actuellement à optimiser ce type de marquage pour les HCT116. Pour le moment, nous pouvons conclure l'inhibition de SHP-2 induit bel et bien des dommages à l'ADN dans les HCT116. Reste à savoir si cela est associé à de la sénescence ou non.

D'autres études réalisées dans d'autres lignées cancéreuses ont aussi décrit un rôle pour SHP-2 dans le contrôle de dommages à l'ADN. Les études de Yuan *et al.*, 2003 ont rapporté que des fibroblastes embryonnaires déficients pour l'expression SHP-2 sont plus résistants à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques comme le cisplatine. En effet, après le traitement au cisplatine, l'induction de p73 et de son effecteur en aval p21 est essentiellement bloquée dans les cellules mutantes pour SHP-2. Une analyse plus approfondie a révélé que l'activation de la

tyrosine kinase nucléaire c-Abl, un médiateur essentiel dans l'induction de dommages à l'ADN, était altéré dans les cellules KO pour SHP-2. Conformément à cette observation, l'effet de la surexpression de la c-Abl kinase dans les cellules mutantes SHP-2 sur la sensibilisation des cellules à la mort induite par les dommages à l'ADN a été aboli. Ces résultats révélaient pour la première fois une nouvelle fonction nucléaire pour la phosphatase SHP-2 dans la régulation de la réponse apoptotique induite par les dommages de l'ADN (Yuan *et al.*, 2003).

Une autre étude de Tsang *et al.*, 2012 a montré que plusieurs phosphatases, y compris SHP-2 étaient nécessaires à la survie des cellules HeLa après un stress réplicatif induit par l'hydroxyurée. Des analyses plus détaillées ont révélé que SHP-2 était également important pour le maintien du point de contrôle après une lésion de l'ADN induite par le cisplatine ou un rayonnement ionisant dans ces mêmes cellules HeLa. En outre, SHP-2 a été activée après un stress réplicatif et des dommages à l'ADN. Finalement, l'étude a démontré que la déplétion de SHP-2 entravait l'activation de CHK1, l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Ces résultats démontraient ainsi l'importance de SHP-2 dans le contrôle du cycle cellulaire et dans la protection contre les lésions à l'ADN (Tsang *et al.*, 2012).

Dans les Caco-2/15, contrairement aux HIEC, nous n'avons pas observé de changement morphologique suite à la baisse d'expression de SHP-2. Cependant, les cellules sous-exprimant SHP-2 prolifèrent moins vite, ce qui est cohérent avec l'inhibition des ERK1/2 et la baisse de phosphorylation de pRb. Contrairement aux HCT116, cette inhibition de prolifération n'est pas associée à une augmentation des dommages à l'ADN, car nous n'avons pas observé d'augmentation du nombre de cellules positives à la phosphorylation de H2AX. Donc, l'inhibition d'expression de SHP-2 dans les Caco-2/15 ralentit leur prolifération sans induire des dommages à l'ADN. Ces résultats différents entre les Caco-2/15 et HCT116 suggèrent que la baisse d'activation des kinases ERK1/2 induite par la déplétion de SHP-2 n'est probablement pas impliquée dans l'apparition des dommages à l'ADN. D'autres mécanismes moléculaires sont probablement responsables de l'apparition des dommages à l'ADN induits par la déplétion de SHP-2 dans les HCT116. Les dommages d'ADN souvent induits par oxydation et apparaissent lors de conditions de stress oxydant (Sharpless *et al.*, 2015). Il faudrait donc analyser si la baisse d'expression de SHP-2 induit bel et bien dans ces deux lignées un stress oxydatif (dosage des radicaux libres) ou non. Par la suite, il pourrait s'avérer pertinent d'analyser l'impact de l'inactivation de SHP-2 sur le

métabolisme aérobie mitochondrial (Zheng *et al.*, 2013) ou sur l'expression de gènes régularisant l'équilibre redox. De plus, il est important de se rappeler que les HCT116 et les Caco-2/15 diffèrent également au niveau de *TP53* : les HCT116 expriment un *TP53* sauvage alors que les Caco-2/15 expriment une forme mutée de *TP53* (Liu & Bodmer, 2006). Or, p53 est capable d'induire transcriptionnellement non seulement p21 mais également d'autres gènes impliqués justement dans l'équilibre Redox (Aquilano *et al.*, 2013). Toutes ces analyses seront à faire pour mieux comprendre les mécanismes d'action moléculaires par lesquels SHP-2 protègent contre l'apparition de dommages à l'ADN dans certaines lignées cancéreuses colorectales.

### **Quelques perspectives importantes pour la suite du projet**

Les résultats de mon projet de maîtrise suscitent des interrogations intéressantes : tout d'abord sur la contribution de la voie ATM/ATR/p53 dans les effets de SHP-2, sur le rôle potentiel de SHP-2 dans l'inhibition du stress oxydatif et sur son importance pour la survie des cellules épithéliales intestinales en culture d'entéroïdes.

Pour déterminer si p53 est impliqué dans les fonctions de SHP-2 dans les cellules cancéreuses, il serait très intéressant de vérifier l'effet de l'inhibition de SHP-2 dans des cellules HCT116 *TP53*<sup>-/-</sup> isogéniques. Notre laboratoire a justement obtenu récemment ces lignées HCT116 isogéniques du Dr Bert Vogelstein (Lindgren *et al.*, 2015). De plus, il faudrait analyser plusieurs autres lignées cancéreuses pour vraiment démontrer s'il y a oui ou non une corrélation avec le statut de *TP53*.

Pour déterminer le rôle de SHP-2 dans la régulation du stress oxydatif, il faudrait analyser la production des radicaux libres (reactive oxygen species, ROS) dans les cellules suite à l'inactivation de SHP-2. J'imagine qu'il serait possible de faire une cinétique pour voir l'évolution des ROS dans le temps et suivre en même temps l'apparition des lésions à l'ADN et les signes de sénescence et/ou d'apoptose (Colavitti *et al.*, 2005). De plus, on pourrait utiliser les organoïdes avec la mutation de gain-de-fonction E76K de SHP-2 (modèle murin généré par Gagné-Sansfaçon en révision) pour faire un comparatif avec notre modèle qui implique plutôt une délétion de SHP-2 et examiner s'il y a effectivement modulation du niveau des radicaux libres différente dans ces deux modèles.

Pour caractériser l'importance de SHP-2 pour la survie des cellules épithéliales intestinales en culture d'entéroïdes, il faudrait faire le marquage des caspases 3 et 7 clivées et/ou un marquage TUNEL afin de vérifier quelles cellules dégénèrent exactement : les cellules souches ? les cellules progénitrices ? les cellules différenciées ? Un test de viabilité serait aussi pertinent à faire. Par ailleurs, il serait intéressant d'analyser l'expression de certains marqueurs de cellules souches afin de mieux comprendre le phénotype des organoïdes. Des résultats préliminaires montrent que l'expression d'*Asc/2*, un marqueur de cellules souches et un gène-cible de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, est augmenté suite à la délétion de SHP-2. Si ce résultat est confirmé, cela pourrait suggérer que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est bel et bien suractivée suite à la délétion de SHP-2 et que cette suractivation pourrait s'avérer être un stress oncogénique pour les cellules souches intestinales. Bien certainement, il serait aussi pertinent d'analyser par immunobuvardage des protéines de jonctions pour voir si leur expression est touchée lorsqu'il y a la perte de SHP-2. Cela pourrait nous aider à s'orienter entre une défaillance dans les cellules souches suite à la délétion de SHP-2 ou bien une intégrité affectée des cellules différenciées par l'inactivation de SHP-2.

Une autre perspective intéressante à mon projet de recherche serait d'analyser si les organoïdes exprimant la forme mutante et active de SHP-2 (celle retrouvée dans le cancer colorectal) sont résistants à des inducteurs de dommages à l'ADN comme le 5-FU ou bien l'oxaliplatine (Grabinger *et al.*, 2014). Autrement dit, est-ce que l'activation constitutive de SHP-2 procure une résistance aux agents qui cause des dommages à l'ADN ? Tout d'abord, il faudrait mettre en culture autant les organoïdes KO que les organoïdes exprimant la forme E76K de SHP-2, ajouter des inducteurs de dommages à l'ADN, puis vérifier par des immunofluorescence le marquage de la phosphorylation de H2AX ou bien aussi des marqueurs de bris d'ADN.

Il serait aussi intéressant de vérifier l'impact de l'inhibition pharmacologique de SHP-2 dans des organoïdes mutés pour *Apc* ou pour *Braf*, deux des principales mutations qui surviennent dans le développement d'un cancer colorectal (Worthley *et al.*, 2007 ; Mundade *et al.*, 2014). Est-ce que l'inactivation de SHP-2 inhibe les effets oncogéniques de ces mutations ? Pour cela, on pourrait utiliser les deux inhibiteurs pharmacologiques de SHP-2 et vérifier leur effet sur la tumorigénèse induite par l'expression oncogénique de *Braf* ou la mutation *Apc* chez la souris. Des organoïdes pourraient aussi être extraits des souris exprimant la forme oncogénique de *Braf* ou la mutation

d'*Apc* et analyser l'impact de l'inactivation de Shp-2 sur la survie, leur prolifération et leur croissance.

Finalement, il est évident qu'il serait pertinent de faire une analyse du phospho-protéome dépendant de SHP-2 par spectrométrie de masse et ce, afin de mieux comprendre les mécanismes d'action moléculaires (par exemple, les substrats) de cette phosphatase dans le contrôle du cycle cellulaire et de la survie tant des cellules normales que cancéreuses.

## **Conclusion**

En conclusion, ce projet a permis de démontrer une fonction importante pour SHP-2 dans la protection contre les dommages à l'ADN tant dans les cellules épithéliales intestinales normales que dans certaines lignées cancéreuses, du moins celles qui ne sont pas mutées pour *TP53*. Ainsi, mes résultats suggèrent que l'activation de SHP-2 promeut la tumorigénèse intestinale non seulement en stimulant la prolifération cellulaire mais également en inhibant l'accumulation de dommages à l'ADN, l'apoptose et/ou la sénescence, dépendamment du contexte cellulaire.

## Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury de mémoire soit François Boudreau et Benoît Chabot d'avoir accepté de le corriger.

Ensuite, je tiens à remercier les membres de mon laboratoire du moment ainsi que ceux qui ont terminé leur cheminement : Katia Beaudry, Anthony Côté-Biron, Ariane Langlois, Marie-Josée Langlois, Valérie Lannoy, Caroline Leblanc, Stephen McManus, Jennifer Raisch et Jessica Gagné-Sansfaçon. Vous m'avez aidée et divertie tous les jours de ma maîtrise. Il est important d'avoir un environnement de laboratoire plaisant pour s'entraider, avoir de bons fous rires et du plaisir dans ce que nous avons en commun soit la recherche... Nos journées ont toujours été parsemées de sourires et d'entraide.

Il y a aussi bien certainement les individus hors laboratoire : mes amis, mes enseignants, mes orthopédagogues ainsi que ma famille. Leur support tout au long de mes études a vraiment été important dans la mise en place de la personne que je suis aujourd'hui. Toutes ces personnes m'ont apporté quelque chose : de l'amusement, des sourires, de l'écoute et de l'encouragement à poursuivre malgré les difficultés.

Aussi, les études graduées seraient inexistantes sans ma directrice de recherche... Merci tout spécialement à toi Nathalie. Tu m'as aidée à évoluer comme étudiante d'une manière encore plus surprenante que je ne pouvais l'imaginer. Tu as cru en moi d'une manière à me donner la chance de me développer dans la vie de tous les jours dans plusieurs sphères de ma personnalité. Ton soutien, ton écoute, ta présence, ton désir de nous pousser plus loin tous les jours avec de nouveaux défis... J'y suis arrivée parce que tu m'as épaulée dans cette histoire d'escalader le Mont Everest dès mon premier cours à la maîtrise. Dès le début, tu m'as ouvert ta porte et tu m'as donné ma chance comme étudiante stagiaire d'abord et par la suite, comme étudiante à la maîtrise. Tu n'as pas eu peur de m'envoyer en congrès. Ces congrès m'ont fait grandir et m'ont amenée à avoir plus de confiance et d'estime en moi-même. Je devais me surpasser et apprendre à gérer tous les gens, les bruits et l'anxiété de bien présenter... Au final, ces congrès vont me manquer parce que l'acquis scientifique et le sentiment d'appartenir à un si beau milieu est magnifique. Merci de ton côté rassurant et parfois maternel surtout à l'approche de mes séminaires de recherche ainsi que mes examens... et on le sait qu'il y avait beaucoup de paroles rassurantes reliées à tout cela ! Mes études graduées ont été parsemées de réussites et d'une belle progression dans ma personnalité puisque tu as mis les efforts, le temps, les réponses à mes milliards de questions, ainsi que la compréhension de la personne que tu avais en avant de toi dans toute sa complexité et surtout je t'ai senti toujours prête à m'aider dans n'importe quelle situation. Merci le plus sincère à toi Nathalie !

## Références

- Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts and Walter. (2016) *Molecular Biology of the Cell*, 6th edition. Garland science.
- Aires, M. B. (2015). Effects of maternal diabetes on trophoblast cells. *World Journal of Diabetes*, 6(2), 338.
- Aliaga, J. C., Deschênes, C., Beaulieu, J. F., Calvo, E. L. et Rivard, N. (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointes*, 277(3 Pt 1), G631-G641.
- Amin, A. R. M. R., Paul, R. K., Thakur, V. S., & Agarwal, M. L. (2007). A novel role for p73 in the regulation of Akt-Foxo1a-Bim signaling and apoptosis induced by the plant lectin, concanavalin A. *Cancer Res*, 67(12), 5617–5621
- Aquilano, K., Baldelli, S., & Ciriolo, M. R. (2014). Glutathione: New roles in redox signalling for an old antioxidant. *Front. Pharmacol.*, 5 AUG(August), 1–12.
- Araki, T., Nawa, H., & Neel, B. G. (2003). Tyrosyl Phosphorylation of Shp2 Is Required for Normal ERK Activation in Response to Some, but Not All, Growth Factors. *J. Biol. Chem.* 278(43), 41677–41684.
- Armaghany, T., Wilson, J. D., Chu, Q., & Mills, G. (2012). Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointestinal Cancer Res. GCR*, 5(1), 19–27. Retrieved from
- Arnold, C. N., Goel, A., Blum, H. E., & Richard Boland, C. (2005). *Mol. Patho. of colorectal cancer. Cancer*, 104(10), 2035–2047
- Bastide, P., Darido, C., Pannequin, J., Kist, R., Robine, S., Marty-Double, C., Bibeau, F., et al. (2007). Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J. of Cell Biol.*, 178(4), 635-648.
- Battle, E., Henderson, J. T., Beghtel, H., Van den Born, M. M. W., Sancho, E., Huls, G., Meeldijk, J., et al. (2002).  $\beta$ -catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/EphrinB. *Cell*, 111(2), 251-263.
- Basak, O., Beumer, J., Wiebrands, K., Seno, H., van Oudenaarden, A., & Clevers, H. (2017). Induced Quiescence of Lgr5+ Stem Cells in Intestinal Organoids Enables Differentiation of Hormone-Producing Enteroendocrine Cells. *Cell Stem Cell*.



- Becker S, Oelschlaeger T a., Wullaert A, Pasparakis M, Wehkamp J, Stange EF, Gersemann M (2013) Bacteria Regulate Intestinal Epithelial Cell Differentiation Factors Both In Vitro and In Vivo. *PLoS One*. 8:(2):1–12.
- Bent, E. H., Gilbert, L. A., & Hemann, M. T. (2016). A senescence secretory switch mediated by PI3K/AKT/mTOR activation controls chemoprotective endothelial secretory responses. *Genes and Dev.*, 30(16), 1811–1821.
- Bentires-Alj M, Paez JG, David FS, Keilhack H, Halmos B, Naoki K, Maris JM, Richardson A, Bardelli A, Sugarbaker DJ, Richards WG, Du J, Girard L, Minna JD, Loh ML, Fisher DE, Velculescu VE, Vogelstein B, Meyerson M, Sellers WR, Neel BG (2004) Activating Mutations of the Noonan Syndrome-Associated SHP2/PTPN11 Gene in Human Solid Tumors and Adult Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer Res*. 64:8816–8820.
- Boucher, M.-J. M.-J., Jean, D., Vézina, A., & Rivard, N. (2004). Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. *Gastrointest and Liver Physiology*, 286(5), G736-46.
- Bray, S. (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Mol. cell biol*, 7(September), 678-689.
- Bryan T. MacDonald; Keiko Tamai and Xi He. (2010). NIH Public Access. *Dev. Biol.*, 17(1), 9–26.
- Bunda, S., Burrell, K., Heir, P., Zeng, L., Alamsahebpoor, A., Kano, Y., ... Ohh, M. (2015). Inhibition of SHP2-mediated dephosphorylation of Ras suppresses oncogenesis. *Nature Comm.*, 6, 8859.
- Campisi, J., & D'Adda Di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biol.*, 8(9), 729–740.
- Cargnello, M., & Roux, P. P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.*, 75(1), 50–83.
- Carragher, L. A. S., Snell, K. R., Giblett, S. M., Aldridge, V. S. S., Patel, B., Cook, S. J., ... Pritchard, C. A. (2010). V600EBraf induces gastrointestinal crypt senescence and promotes tumour progression through enhanced CpG methylation of p16INK4a. *EMBO Mol. Med.*, 2(11), 458–471.
- Chen, Y.-N. P., LaMarche, M. J., Chan, H. M., Fekkes, P., Garcia-Fortanet, J., Acker, M. G., ... Fortin, P. D. (2016). Allosteric inhibition of SHP2 phosphatase inhibits cancers driven by receptor tyrosine kinases. *Nature*, 535(7610), 148–152.
- Clevers, H. (2006). Wnt/B-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell*.

- Clevers HC, Bevins CL (2013) Paneth Cells: Maestros of the Small Intestinal Crypts. *Annu. Rev. Physiol.* 75:(1):289–311.
- Colavitti, R., & Finkel, T. (2005). Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. *IUBMB Life*, 57(4–5), 277–281.
- Collado, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell*, 130(2), 223–233.
- Collado, M., & Serrano, M. (2006). The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 472. Retrieved from
- Coulombe, G., Leblanc, C., Cagnol, S., Maloum, F., Lemieux, E., Perreault, N., ... Rivard, N. (2013). Epithelial Tyrosine Phosphatase SHP-2 Protects against Intestinal Inflammation in Mice. *Mol. and Cell. Biol.*, 33(11), 2275–2284.
- Coulombe, G., & Rivard, N. (2016). New and Unexpected Biological Functions for the Src-Homology 2 Domain-Containing Phosphatase SHP-2 in the Gastrointestinal Tract. *CMGH Cell. and Mol. Gastroenterol. and Hepatol.*, 2(1), 11–21.
- Dance, M., Mecanismes, N., Des, D. A., Ras, V., & Et, M. (2007). UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III - *Sciences*.
- Demaria, M., O’Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., ... Campisi, J. (2017). Cellular senescence promotes adverse effects of chemotherapy and cancer relapse. *Cancer Discovery*, 7(2), 165–176.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., ... Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(20), 9363–9367.
- Evan, G. I., & d’Adda di Fagagna, F. (2009). Cellular senescence: hot or what? *Current Opinion in Genetics & Dev.*, 19(1), 25–31.
- Feng, Y., Bommer, G. T., Zhao, J., Green, M., Sands, E., Zhai, Y., Brown, K., et al. (2011). Mutant kras promotes hyperplasia and alters differentiation in the colon epithelium but does not expand the presumptive stem cell pool. *Gastroenterol.*, 141(3).
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., & Huelsken, J. (2007). Wnt/ -Catenin Is Essential for Intestinal Homeostasis and Maintenance of Intestinal Stem Cells. *Mol. and Cell. Biol.*, 27(21), 7551–7559.

- Fischer, A., & Gessler, M. (2007). Delta-Notch-and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.*, 35(14), 4583–4596.
- Fre, S., Huyghe, M., Mourikis, P., Robine, S., Louvard, D. et Artavanis-Tsakonas, S. (2005). Notch signals control the fate of immature progenitor cells in the intestine. *Nature*, 435(7044), 964-8.
- Gagné-Sansfaçon, J., Coulombe, G., Langlois, M.-J., Langlois, A., Paquet, M., Carrier, J., ... Rivard, N. (2016). SHP-2 phosphatase contributes to KRAS-driven intestinal oncogenesis but prevents colitis-associated cancer development. *Oncotarget*, 7(40), 65676–65695.
- Garneau, H., Paquin, M. C., Carrier, J. C. et Rivard, N. (2009). E2F4 expression is required for cell cycle progression of normal intestinal crypt cells and colorectal cancer cells. *J. of Cell. Physiology*, 221(2), 350-358.
- Grabinger, T., Luks, L., Kostadinova, F., Zimmerlin, C., Medema, J. P., Leist, M., & Brunner, T. (2014). Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy. *Cell Death and Disease*, 5(5), e1228-10.
- Gregorieff, A., Pinto, D., Begthel, H., Destrée, O., Kielman, M., & Clevers, H. (2005). Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. *Gastroenterol.*, 129(2), 626–638.
- Groden, J., Thliveris, a, Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66(3), 589-600.
- Harbour J.W., Luo, R.X., Dei Santi, A., Postigo, A.A. and Dean, D.C. (1999) Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell* 98 (6), 859-869
- He, S., & Sharpless, N. E. (2017). Senescence in Health and Disease. *Cell*, 169(6), 1000–1011.
- Hollenhorst, P. C., McIntosh, L. P. et Graves, B. J. (2011). Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annual review of biochemistry*, 80(1), 437-471.
- Heuberger, J., Kosel, F., Qi, J., Grossmann, K. S., Rajewsky, K., & Birchmeier, W. (2014). Shp2/MAPK signaling controls goblet/paneth cell fate decisions in the intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 111(9), 3472–3477.
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 341. Retrieved from

- Ireland, H., Kemp, R., Houghton, C., Howard, L., Clarke, A. R., Sansom, O. J., & Winton, D. J. (2004). Inducible cre-mediated control of gene expression in the murine gastrointestinal tract: effect of loss of  $\beta$ -catenin. *Gastroenterol.*, 126(5), 1236–1246.
- Ishizuka S, et al. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a survival factor for radiation-exposed intestinal epithelial stem cells in vivo. *Nucleic Acids Res* 31: 6198-6205.
- Jass, J. R. (2002). Pathogenesis of colorectal cancer. *Surgical Clinics of North America*.
- Kang, C., Xu, Q., Martin, T. D., Li, M. Z., Demaria, M., Aron, L., ... Elledge, S. J. (2015). The DNA damage response induces inflammation and senescence by inhibiting autophagy of GATA4. *Science*, 349(6255), aaa5612-aaa5612.
- Kinzler, K. W., Nilbert, M. C., Vogelstein, B., Bryan, T. M., Levy, D. B., Smith, K. J., Preisinger, a C., et al. (1991). Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4999), 1366-1370.
- Knight, T., & Irving, J. A. E. (2014). Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. *Front. in Oncol.* 4(June), 1–12.
- Koch, S. (2017). Extrinsic control of Wnt signaling in the intestine. *Differentiation*, 97(June), 1–8.
- Kojima, H., Inoue, T., Kunimoto, H., & Nakajima, K. (2013). IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *Jak-Stat*, 2(4), e25763.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P. J. et Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nature genetics*, 19, 379-383.
- Kuhnert, F., Davis, C. R., Wang, H.-T., Chu, P., Lee, M., Yuan, J., ... Kuo, C. J. (2004). Essential requirement for Wnt signaling in proliferation of adult small intestine and colon revealed by adenoviral expression of Dickkopf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(1), 266–71.
- Kuilman, T., & Peeper, D. S. (2009). Senescence-messaging secretome: SMS-ing cellular stress. *Nature Reviews Cancer*, 9(2), 81–94. [h](#)
- Lan, L., Holland, J. D., Qi, J., Grosskopf, S., Vogel, R., & Györfy, B. (2015). Shp 2 signaling suppresses senescence in PyMT -induced mammary gland cancer in mice, 34(18), 1–17.
- Lindgren, T., Stigbrand, T., Råberg, A., Riklund, K., Johansson, L., & Eriksson, D. (2015). Genome wide expression analysis of radiation-induced DNA damage responses in isogenic HCT116 p53+/+ and HCT116 p53-/- colorectal carcinoma cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.*, 91(1), 99–111.

- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., ... Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase is lysosomal  $\beta$ -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195.
- Lemieux, E., Boucher, M.-J., Mongrain, S., Boudreau, F., Asselin, C. et Rivard, N. (2011). Constitutive activation of the MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation. *American journal of physiology. Gastrointest. and liver physiol.*, 301(4), G719-30.
- Lynch, H. T. et de la Chapelle, A. (2003). Hereditary Colorectal Cancer. *New England J. of Med.*, 348(10), 919-932.
- Madison, B. B., Dunbar, L., Qiao, X. T., Braunstein, K., Braunstein, E., & Gumucio, D. L. (2002). cis Elements of the Villin Gene Control Expression in Restricted Domains of the Vertical (Crypt) and Horizontal ( Duodenum , Cecum ) Axes of the Intestine \*, 277(36), 33275–33283.
- Mallette, F. A. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence, (514), 43–48.
- Marieb, E. N. et Hoehn, K. (2015). Anatomie et physiologie humaine (ERPI.). Montréal.
- Meng, L., Quezada, M., Levine, P., Han, Y., McDaniel, K., Zhou, T., ... Alpini, G. (2015). Functional Role of Cellular Senescence in Biliary Injury. *American J. of Pathol.*, 185(3), 602–609.
- Miyoshi, H., & Stappenbeck, T. S. (2013). In vitro expansion and genetic modification of gastrointestinal stem cells in spheroid culture. *Nature Prot.*, 8, 2471. Retrieved from
- Mori-Akiyama, Y., van den Born, M., van Es, J. H., Hamilton, S. R., Adams, H. P., Zhang, J., Clevers, H., et al. (2007). SOX9 Is Required for the Differentiation of Paneth Cells in the Intestinal Epithelium. *Gastroenterol.*, 133(2), 539-546.
- Mundade, R., Imperiale, T. F., Prabhu, L., Loehrer, P. J., & Lu, T. (2014). Genetic pathways, prevention, and treatment of sporadic colorectal cancer. *Oncoscience*, 1(6), 400.
- Murphy, L. O. et Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends in Biochemical Sciences*.
- Nardella, C., Clohessy, J. G., Alimonti, A., & Pandolfi, P. P. (2011). Pro-senescence therapy for cancer treatment. *Nature Rev. Cancer*, 11(7), 503–511.
- Olive, P. L., Banath, J. P. (2006) The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1, 23-29.

- Ouellette AJ (2011) Paneth cell  $\alpha$ -defensins in enteric innate immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* 68:2215– 2229.
- Perreault, N., & Beaulieu, J.-F. (1996). Use of the Dissociating Enzyme Thermolysin to Generate Viable Human Normal Intestinal Epithelial Cell Cultures. *Exp. Cell Res.*, 224(2), 354–364.
- Pearson, M., & Pelicci, P. G. (2001). PML interaction with p53 and its role in apoptosis and replicative senescence, 7250–7256.
- Pino, M. S. et Chung, D. C. (2010). The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterol.*, 138(6), 2059-2072.
- Pinto, D., Gregorieff, A., Begthel, H. et Clevers, H. (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes and Dev.*, 17(14), 1709-1713.
- Poole, A. W., & Jones, M. L. (2005). A SHPing tale: Perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail. *Cellular Signalling*, 17(11), 1323–1332.
- Qian, Y., & Chen, X. (2010). Tumor suppression by p53: Making cells senescent. *Histol. Histopathol.*, 25(4), 515–526.
- Qiu, W., Wang, X., Romanov, V., Hutchinson, A., Lin, A., Ruzanov, M., ... Chirgadze, N. Y. (2014). Structural insights into Noonan/LEOPARD syndrome-related mutants of protein-tyrosine phosphatase SHP2 (PTPN11). *BMC Struct. Biol.*, 14(1), 10.
- Quignon F, De Bels F, Koken M, Feunteun J, Ameisen JC, de The H. (1998) PML induces a novel caspase-independent death process. *Nat Genet.* 20(3):259–265.
- Rivard, N., Boucher, M.-J., Asselin, C., & L'Allemain, G. (1999). MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *American J. of Physiol.*, 277, C652–C664.
- Riccio, O., van Gijn, M. E., Bezdek, A. C., Pellegrinet, L., van Es, J. H., Zimmer-Strobl, U., Strobl, L. J., et al. (2008). Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2. *EMBO reports*, 9(4), 377-83.
- Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD (2013) Noonan syndrome. *Lancet.* 381:333–342.
- Rodier, F., & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *J. of Cell Biol.*, 192(4), 547–556.

- Salama, R., Sadaie, M., Hoare, M., & Narita, M. (2014). Cellular senescence and its effector programs Cellular senescence and its effector programs, 99–114.
- Sancho, R., Cremona, C. A., & Behrens, A. (2015). Stem cell and progenitor fate in the mammalian intestine: Notch and lateral inhibition in homeostasis and disease. *EMBO Reports*, 16(5), 571–81.
- Sato, T., Stange, D. E., Ferrante, M., Vries, R. G. J., Van Es, J. H., Van Den Brink, S., ... Clevers, H. (2011). Long-term expansion of epithelial organoids from human colon, adenoma, adenocarcinoma, and Barrett's epithelium. *Gastroenterology*, 141(5), 1762–1772.
- Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C. et Li, L. (2008). Current View: Intest. Stem Cells and Signal. *Gastroenterol.*, 134(3), 849-864.
- Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S. W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16(INK4a). *Cell*, 88(5), 593–602.
- Sharpless, N. E., & Sherr, C. J. (2015). Forging a signature of in vivo senescence. *Nature Rev. Cancer*, 15(7), 397–408.
- Sherr C.J. (1996) *Cancer cell cycles Science* 274 (5293), 1672-1677
- Sturla, L.-M., Zinn, P. O., Ng, K., Nitta, M., Kozono, D., Chen, C. C., & Kasper, E. M. (2011). Src homology domain-containing phosphatase 2 suppresses cellular senescence in glioblastoma. *British J. of Cancer*, 105(8), 1235–1243.
- Tajan M, de Rocca Serra A, Valet P, Edouard T, Yart A (2015) SHP2 sails from physiology to pathology. *Eur. J. Med. Genet.* 58:(10):509–525.
- Tamai, K., Zeng, X., Liu, C., Zhang, X., Harada, Y., Chang, Z., & He, X. (2004). A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation. *Mol. Cell*, 13(1), 149–156.
- Tao S, et al. (2015) Wnt activity and basal niche position sensitize intestinal stem and progenitor cells to DNA damage. *EMBO J* 34: 624-640.
- Tartaglia M, Martinelli S, Cazzaniga G, Cordeddu V, Iavarone I, Spinelli M, Palmi C, Carta C, Pession A, Aricò M, Masera G, Basso G, Sorcini M, Gelb BD, Biondi A (2004) Genetic evidence for lineage-related and differentiation stage-related contribution of somatic PTPN11 mutations to leukemogenesis in childhood acute leukemia. *Blood*. 104:(2):307–313.

- Tartaglia, M., Mehler, E. L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H. G., Kremer, H., ... Gelb, B. D. (2001). Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nature Genetics*, 29, 465. Retrieved from
- Tartaglia M, Niemeyer CM, Song X, Buechner J, Jung A, Hählen K, Hasle H, Licht JD, Gelb BD (2003) Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia , myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat. Genet.* 34:(2):148–151.
- Turner AM (2014) Noonan syndrome. *J. Paediatr. Child Health*. 50:(10):E14–E20.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*. 29:(1):52, 54.
- Tsang, Y. H., Han, X., Man, W. Y., Lee, N., & Poon, R. Y. C. (2012). Novel Functions of the Phosphatase SHP2 in the DNA Replication and Damage Checkpoints. *PLoS ONE*, 7(11).
- Valenta, T., Degirmenci, B., Moor, A. E., Herr, P., Zimmerli, D., Moor, M. B., Hausmann, G., et al. (2016). Wnt Ligands Secreted by Subepithelial Mesenchymal Cells Are Essential for the Survival of Intestinal Stem Cells and Gut Homeostasis. *Cell Reports*, 15(5), 911 - 918.
- van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A. M., Mao, M., ... Friend, S. H. (2002). Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 415, 530. Retrieved from
- Van der Flier, L. G., Sabates-Bellver, J., Oving, I., Haegbarth, A., De Palo, M., Anti, M., ... Clevers, H. (2007). The Intestinal Wnt/TCF Signature. *Gastroenterol.*, 132(2), 628–632.
- Van Es, J. H., Van Gijn, M. E., Riccio, O., Van Den Born, M., Vooijs, M., Begthel, H., ... Clevers, H. (2005). Notch/ $\gamma$ -secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells. *Nature*, 435(7044), 959–963.
- Vogelstein B., Kenneth W. Kinzler, Lengauer C. (1998) Genetic instabilities in human cancers *Nature vol.* 396, pages 643–649
- Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Rev. Cancer*, 9(7), 489–499.
- Wang, Y., George, S. P., Roy, S., Pham, E., Esmailniakooshkghazi, A., & Khurana, S. (2016). Both the anti-and pro-apoptotic functions of villin regulate cell turnover and intestinal homeostasis. *Scientific Reports*, 6(October), 1–10.



- Wang ZG, Ruggero D, Ronchetti S, Zhong S, Gaboli M, Rivi R, et al. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Nat Genet.* 1998;20(3):266–272.
- Weigelt, B., & Reis-Filho, J. S. (2009). Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nature Rev. Clinical Oncology*, 6, 718. Retrieved from
- Worthley, D. L., Whitehall, V. L., Spring, K. J. et Leggett, B. A. (2007). Colorectal carcinogenesis: Road maps to cancer. *World J. of Gastroenterol.*
- Xu, J., Zeng, L. F., Shen, W., Turchi, J. J., & Zhang, Z. Y. (2013). Targeting SHP2 for EGFR inhibitor resistant non-small cell lung carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 439(4), 586–590.
- Xu, M., Yu, Q., Subrahmanyam, R., Difilippantonio, M. J., Ried, T., & Sen, J. M. (2008). -Catenin Expression Results in p53-Independent DNA Damage and Oncogene-Induced Senescence in Prelymphomagenic Thymocytes In Vivo. *Mol. and Cell. Biol.*, 28(5), 1713–1723.
- Xu, Q., Mellitzer, G., Robinson, V. et Wilkinson, D. G. (1999). In vivo cell sorting in complementary segmental domains mediated by Eph receptors and ephrins. *Nature*, 399(6733), 267-271.
- Yuan, L., Yu, W. M., Yuan, Z., Haudenschild, C. C., & Qu, C. K. (2003). Role of SHP-2 tyrosine phosphatase in the DNA damage-induced cell death response. *J. of Biol. Chem.*, 278(17), 15208–15216.
- You, M., Yu, D.-H., & Feng, G.-S. (1999). Shp-2 Tyrosine Phosphatase Functions as a Negative Regulator of the Interferon-Stimulated Jak/STAT Pathway. *Mol. and Cell. Biol.*, 19(3), 2416–2424.
- Zhan, Y., Counelis, G. J., & O'Rourke, D. M. (2009). The protein tyrosine phosphatase SHP-2 is required for EGFRvIII oncogenic transformation in human glioblastoma cells. *Expe. Cell Res.*, 315(14), 2343–57.
- Zhang, J., Zhang, F., & Niu, R. (2015). Functions of Shp2 in cancer. *J. of Cell. and Mol. Med.*, 19(9), 2075–2083.
- Zhang, X., He, Y., Liu, S., Yu, Z., Jiang, Z., Yang, Z., ... Zhang, Z. (2010). A salicylic acid-based small molecule inhibitor for the oncogenic Src homology-2 domain containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP2). *J. of Med. Chem.*, 53(6), 2482–2493.
- Zouiten-Mekki, L., Serghini, M., Fekih, M., Kallel, L., Matri, S., Ben Mustapha, N., ... Filali, A. (2013). Epithelial cell in intestinal homeostasis and inflammatory bowel diseases. *Med. Sciences : M/S*, 29(12), 1145–50.

Zhou XD, Agazie YM. (2008) Inhibition of SHP2 leads to mesenchymal to epithelial transition in breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 15:988–996.